

FITC-el jelölt és crizotinibbel konjugált GnRH analógok előállítása, vizsgálata és jelentősége a célzott daganatterápiában

Doktori értekezés

Murányi József

Semmelweis Egyetem
Gyógyszertudományok Doktori Iskola



Témavezetők:

Dr. Vántus Tibor, Ph.D., tudományos főmunkatárs
Dr. Kéri György[†], D.Sc., egyetemi tanár

Hivatalos bírálók:

Dr. Mészáros György, Ph.D., egyetemi docens
Dr. Szabó Ildikó, Ph.D., tudományos munkatárs

Szigorlati bizottság elnöke:
Szigorlati bizottság tagjai:

Dr. Török Tamás, D.Sc., professor emeritus
Dr. Klebovics Imre, D.Sc., egyetemi tanár
Dr. Bánóczy Zoltán, Ph.D., egyetemi adjunktus

Budapest
2018

Tartalomjegyzék

1. Rövidítések jegyzéke	5
2. Irodalmi áttekintés	7
2.1 Bevezetés.....	7
2.2 A daganatos megbetegedésekről általánosan	8
2.3 Jelátviteli daganatterápia	9
2.4 Proteinkináz-gátlók	11
2.5 Crizotinib jelentősége a daganatterápiában.....	14
2.5.1 Molekuláris célpontok.....	15
2.5.2 Kémiai szerkezet, szerkezet-hatás összefüggés	19
2.5.3 Klinikai tapasztalatok, hatás, mellékhatás és rezisztencia	21
2.6 Célzott hatóanyag-szállító rendszerek a daganatterápiában	23
2.7 GnRH és receptora	24
2.8 GnRH analógok jelentősége a daganatterápiában	26
2.8.1 Hormonfüggő daganatok terápiája.....	28
2.8.2 GnRH analógok direkt daganatellenes hatása	29
2.8.3 GnRH, mint irányító molekula.....	30
2.8.4 Daganatellenes GnRH konjugátumok.....	31
2.8.5 Diagnosztikai célú GnRH konjugátumok és a GnRH-R-célzott terápia korlátai	35
3. Célkitűzések	38
4. Anyagok és módszerek	39
4.1 Felhasznált anyagok	39
4.2 Analitikai módszerek.....	39
4.2.1 VRK	39
4.2.2 HPLC	39
4.2.3 Tömegspektrometria és ¹ H NMR spektrometria	40
4.3 Szintézisek.....	41
4.3.1 Crizotinib és analógjainak előállítása.....	41
4.3.2 GnRH analógok előállítása, a peptidlánc felépítése.....	54
4.3.3 Fluoreszcens jelölés	55
4.3.4 Crizotinib analógok konjugálása.....	55
4.3.5 GnRH analógok és konjugátumok hasítása a gyantáról.....	56
4.3.6 GnRH analógok és konjugátumok tisztítása, liofilizálása.....	56
4.4 Oldhatóság vizsgálat	57
4.5 Permeabilitás vizsgálat.....	57
4.5.1 PAMPA.....	57
4.5.2 MDCK.....	57

4.6 Stabilitás vizsgálat.....	58
4.7 Sejtkultúrák	58
4.8 Western blot analízis	59
4.9 Sejt-életképesség meghatározás	60
4.9.1 MTT	60
4.9.2 CellTiter-Glo®	61
4.10. Konfokális lézer pásztázó mikroszkóp (CLSM)	61
4.10.1 GnRH-R vizsgálata immuncitokémiai módszerrel	62
4.10.2 FITC-GnRH konjugátumok vizsgálata	62
4.10.3 FITC-GnRH konjugátumok és GnRH-I-R egyidejű vizsgálata	62
4.10.4 FITC-GnRH konjugátumok és a lizoszómák egyidejű vizsgálata	63
4.11 Áramlási citométer	63
5. Eredmények	64
5.1 FITC-GnRH konjugátumok előállítása és fizikai-kémiai karakterizálása.....	64
5.1.1 Oldhatóság és stabilitás	66
5.1.2 Permeabilitás	66
5.1.3 Citotoxicitás	67
5.2 FITC-GnRH konjugátumok vizsgálata daganatsejteken	68
5.2.1 GnRH-R expresszió	68
5.2.2 Összefüggés a membrán GnRH-I-R és a FITC-GnRH mennyisége között	69
5.2.3 A sejtfelszíni GnRH-I-R hiánya BxPC-3 sejteken	71
5.2.4 FITC-GnRH konjugátumok koncentrációfüggő bejutása a sejtekbe	71
5.2.5 FITC-GnRH konjugátumok lokalizációja.....	72
5.2.6 FITC-GnRH mennyiségének kvantitatív vizsgálata	74
5.3 Crizotinib totálszintézise	77
5.4 Crizotinib-GnRH-I konjugátum előállítása és vizsgálata.....	80
5.4.1 Életképesség gátló hatás EBC-1 sejtvonalon	81
5.4.2 c-Met-gátló hatás.....	82
5.5 Crizotinib analógok.....	82
5.5.1 Alifás hidroxilcsoporttal rendelkező crizotinib analógok előállítása	82
5.5.2 További crizotinib analógok előállítása	85
5.5.3 Életképesség gátló hatás EBC-1 sejtvonalon	88
5.5.4 Oldhatóság és stabilitás	88
5.5.5 Permeabilitás a pH függvényében.....	89
5.5.6 Enantiomer-tiszta analógok életképesség gátló hatása EBC-1 és NIH/3T3 sejtvonalakon	90
5.5.7 Enantiomer-tiszta analógok <i>in vitro</i> kináz-gátlása	92
5.6 Crizotinib analógokból előállított GnRH konjugátumok	92
5.6.1 Életképesség gátló hatás EBC-1 és NIH/3T3 sejtvonalakon.....	96

5.6.2 Stabilitás.....	97
5.6.3 Oldhatóság és permeabilitás.....	99
5.6.4 Kötődés a GnRH receptorhoz	100
5.6.5 GnRH-irányított hatóanyagtranszport hatása	101
6. Megbeszélés	104
6.1 FITC-jelölt GnRH analógok.....	105
6.2 Crizotinib-GnRH konjugátumok.....	109
6.3 Lizoszóma-csapda-teória.....	117
7. Következtetések	121
8. Összefoglalás	123
9. Summary	124
10. Irodalomjegyzék:	125
11. Saját publikációk.....	146
12. Köszönetnyilvánítás.....	147
13. Melléklet	148
13.1 FITC-GnRH konjugátumok	148
13.1.1 Szerkezetigazolás	148
13.1.3 PAMPA számítási képlet	150
13.1.4 Áramlási citométer számítási képlet	150
13.1.5 MDCK HPLC-UV kromatogramok.....	151
13.2 Crizotinib analógok és konjugátumok.....	152
13.2.1 Crizotinib analógok szerkezetigazolása	152
13.2.2 Crizotinib-konjugátumok szerkezetigazolása	157
13.2.3 <i>In vitro</i> c-Met-gátló hatékonyság vizsgálata	159
13.2.4 Crizotinib-GnRH-I és MJ95-GnRH-I stabilitás vizsgálata lizoszóma preparátumban	159

1. Rövidítések jegyzéke

ACN	acetonitril
ALK	anaplasztikus limfóma kináz
Boc	<i>tert</i> -butoxikarbonil
BSA	szarvasmarha szérum albumin
CLSM	konfokális lézer pásztázó mikroszkóp
c-Met	hepatocita növekedési faktor receptor (HGFR)
crizotinib-GnRH-I	[D-Lys ⁶ (crizotinib)]-GnRH-I
ekv.	ekvivalens
FITC	fluoreszcein-izotiocianát
COMU	(1-Cyano-2-ethoxy-2-oxoethylidenaminooxy)dimethylamino morpholino-carbenium hexafluorophosphate
DCC	N,N'-diciklohexil-karbodiimid
DKM	diklórmétán
D-Lys	D-lizin
DMAP	4-dimetilamino-piridin
DMF	dimetil-formamid
DIPEA	N,N-diizopropil-etilamin
DMSO	dimetil-szulfoxid
EtOAc	etil-acetát
FBS	magzati szarvasmarha szérum
FDA	amerikai Élelmiszer- és Gyógyszerengedélyeztetési Hivatal
FITC-GnRH-I	[D-Lys ⁶ (FITC)]-GnRH-I
FITC-GnRH-II	[D-Lys ⁶ (FITC)]-GnRH-II
FITC-GnRH-III	[Lys ⁸ (FITC)]-GnRH-III
GnRH	gonadotropin-felszabadító hormon
GnRH-R	gonadotropin-felszabadító hormon receptorok
GnRH-I-R	egyes típusú gonadotropin-felszabadító hormon receptor

HPLC	nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia
MJ37-GnRH-I	[D-Lys ⁶ (MJ37)]-GnRH-I
MJ55-GnRH-I	[D-Lys ⁶ (MJ55)]-GnRH-I
(R)-MJ55-GnRH-III	[Lys ⁸ ((R)-MJ55)]-GnRH-III
MJ95-GnRH-I	[D-Lys ⁶ (MJ95)]-GnRH-I
MS	tömegspektrométer
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium-bromid
NMM	N-metil-morfolin
NSCLC	nem-kissejtes tüdőrák
PAMPA	mesterséges membrán alapú permeabilitás vizsgálat
PBS	foszfát-pufferes sóoldat
Pd(dppf)Cl ₂	[1,1'- <i>bisz</i> (difenilfoszfino)ferrocén]dikloropalládium(II)
R _f	retenció faktor
RIPA	radioimmunoprecipitation assay buffer
RON	Recepteur d'Origine Nantais (receptor tirozin kináz)
ROS1	ROS1 receptor tirozin kináz
SD	tapasztalati szórás
TEA	triethyl-amin
TFA	trifluorecetsav
THF	tetrahidrofurán
t _R	retenció idő
VRK	vékonyréteg kromatográfia

2. Irodalmi áttekintés

2.1 Bevezetés

A daganatos megbetegedések kialakulásának és progressziójának hátterében álló folyamatok megértése napjaink egyik legnagyobb tudományos kihívása. Az intenzíven zajló kutatások eredményeképp a közelmúltban számos olyan tudományos áttörés született, melyek új lehetőségeket teremtenek a rosszindulatú daganatok, a rák elleni küzdelemben. A diagnosztikai és a terápiás módszerek fejlődésének hajtóerejét az az aggasztó tény adja, hogy a daganatos megbetegedés nemzetközi viszonylatban a második vezető halálok.

A daganatok diagnózisában a korszerű képalkotó eljárások mellett egyre nagyobb jelentőséggel bír a molekuláris patológia, mely modern genomikai és proteomikai módszereken alapul. A beazonosított genetikai hibák, illetve túltermelődő fehérjék fontos biomarkerek, melyek terápiás célpontok is lehetnek. A molekuláris patológia eredményeit rohamléptekkel követi a gyógyszerfejlesztés, a klinikai terápiákban pedig ezekhez az új lehetőségekhez igazodó szemléletváltás figyelhető meg.

A daganatok gyógyszeres kezelésének intenzíven fejlődő ága a személyre szabott jelátviteli terápia. A közel negyven forgalomban lévő jelátvitelt gátló készítmény mellett, mint például a Xalkori® néven forgalmazott kismolekulás tirozin kináz-gátló, világszerte több száz ilyen hatásmechanizmusú gyógyszermolekulával zajlanak a klinikai vizsgálatok.

A hormon-szenzitív daganatok kezelésének egyik hagyományos módja különféle hormon analógok alkalmazásán alapul. Ezen hatóanyagok közé tartozik a gonadotropin felszabadító hormon (GnRH) néhány szintetikus analógja is. A GnRH analógok daganatellenes hatóanyag-szállító rendszerként történő alkalmazhatóságára azonban csak a közelmúltban figyeltek fel.

A hatóanyag-szállító rendszerek jellemzője, hogy a hatóanyagot szabályozottan, a megfelelő helyen és időben adják le, ennek köszönhetően a modern gyógyszerfejlesztésben új korszakot nyitottak. A daganatellenes hatóanyag-szállító rendszerek feladata, hogy az egészséges- és a ráksejtek közötti eltéréseket kihasználva szelektív dúsulást érjenek el a daganatokban. Ezzel a stratégiával a daganatellenes hatóanyagok mellékhatásai csökkenthetők, hatásuk fokozható, sőt akár a rezisztencia kialakulása is késleltethető.

2.2 A daganatos megbetegedésekről általánosan

A daganatos megbetegedések tekintetében, 2015-ben 17,5 millió új esetet és 8,7 millió halálesetet regisztráltak világszerte. A statisztikai adatok alapján a szív és érrendszeri betegségek után a rák a másik vezető halálok napjainkban. Mivel az egyre korszerűbb eljárások ellenére sem sikerül a rosszindulatú daganatok miatti halálesetek számát jelentősen csökkenteni, ezért ez a betegség az egyik legjelentősebb kihívást jelenti az egészségügy számára [1].

Szöveti eredet alapján egy rosszindulatú daganat lehet: laphám (karcinóma), festékhám (melanóma), ér (angioszarkóma), kötőszöveti (szarkóma), idegrendszeri (glióma), nyirokrendszeri (limfóma) vérképző rendszeri (leukémia) és magzati (teratóma) eredetű. Kialakulásuk genetikai hátterét tekintve két csoportra oszthatóak: környezeti, vagy örökletes. Az első esetben alapvetően környezeti faktorok okozzák a rákhoz vezető mutációk felhalmozódását, az erre való hajlamot azonban a genetikai tényezők is növelhetik. A második esetben egyértelműen az örökölt gének hordozzák magukban a rák kialakulásához vezető rendellenességeket.

Az egészséges és a ráksejtekben egyaránt előfordulnak DNS hibák. A rák kialakulása szempontjából azonban csak az úgynevezett irányító (vagy driver) mutációk kritikusak. Az irányító mutációk növekedési előnnyel ruházzák fel a sejteket, ezáltal aktívan részt vesznek a rosszindulatú tumorok patomechanizmusában. Ezzel ellentétben az utazó mutációk segítségével a ráksejt elődje nem jut előnyhöz a többi sejtrel szemben, így a tumorok kifejlődésében sem játszanak szerepet. Az irányító mutációk közé sorolhatók egy adott kezeléssel szembeni rezisztenciát okozó DNS-elváltozások is. Ezen mutációk egyáltalán nem, vagy csak néhány sejtben vannak jelen a kezelés kezdetén. Azonban a kezelés hatására a sejtek szelekciós környezete megváltozik, ezáltal a rezisztenciát hordozó sejtek elszaporodnak, a daganat újra növekedésnek indul.

Jelenlegi ismereteink szerint a rák kialakulásához minden esetben több irányító mutáció együttes jelenléte szükséges [2]. A ráksejtekre az alábbi általános tulajdonságok jellemzők: fokozott és folyamatos sejtosztódás, növekedést gátló faktorok kikapcsolása, programozott sejthalál elkerülése, korlátlan számú sejtosztódás képessége, invazív viselkedés, áttétképzés, immunrendszer kikerülése, megváltozott metabolizmus, illetve egyedi epigenetikus módosulások [3].

A rák gyógyszeres kezelésére hagyományosan kemoterápiás szereket és citotoxikus vegyületeket alkalmaznak. Ezen széles körben alkalmazott molekulák bár hatékony

eszközök a daganatok növekedésének megfékezésére, alkalmazásuk számos súlyos mellékhatással jár, melyek a betegek életminőségét jelentősen rontják [4]. Ezért intenzív kutatások folynak hatékonyabb és szelektívebb daganatellenes hatóanyagok fejlesztésére. Az elmúlt évek során robbanásszerűen elterjedő jelátvitelt gátló kismolekulás vegyületek a legeredményesebb daganatellenes hatóanyagok közé tartoznak jelenleg. Esetükben a szerkezetükből adódó korlátozott szelektivitás, hatásmechanizmusukból eredő gyorsabban kialakuló rezisztencia, és a jelátviteli rendszerek összetettsége jelenti a legnagyobb kihívást [5].

2.3 Jelátviteli daganatterápia

A jelátviteli terápia általánosságban az inter- és intracelluláris jelátviteli zavarokra visszavezethető molekuláris pathomechanizmusok gyógyszeres terápiáját jelenti, ami számos betegséget érint. A daganatok mutációi a sejteken belüli és a környező sejtekkel folytatott rendellenes kommunikációhoz (jelátviteli zavarhoz), ezáltal a sejttársadalomban betöltött kooperatív szerep elvesztéséhez vezetnek. A cél az egészséges és a kóros sejtek közötti eltérések felismerése, azonosítása, valamint a potenciális molekuláris célpontok kedvező irányú befolyásolása. A daganatsejtek elpusztítását a szelektív növekedési előnyt okozó onkogén fehérjék gátlásával, vagy a kontroll nélküli növekedést fékező tumor szupresszor fehérjék újra-aktiválásával lehet elérni [2]. A jelátviteli daganatterápia gyakorlati alkalmazása azon alapul, hogy a daganatok többnyire érzékenyek túltermelő, onkogén fehérjék gátlására, azonban az egészséges sejtek redundáns jelátviteli útjaik segítségével, rugalmasabban képesek az érintett fehérjék gátlását kompenzálni. [6].

A hatékony egyénre szabott kezelési stratégia felállításához a különféle biomarkerek széleskörű ismeretére van szükség. A prediktív biomarkerek azonosítása napjainkban elsősorban korszerű genomikai és proteomikai módszereken alapul. Ilyen módszerek például a különféle génszekvenálási technikák, a DNS és fehérje mikroarrayek, a tömegspektrometriával kombinált mikrofluidikai technikák, de ígéretes megoldásnak tűnik a vérben keringő tumor sejtek vizsgálata is. A megbízható prediktív biomarkerekre az onkológiai hatóanyag-fejlesztés alacsony sikerrátájának a növelése miatt is óriási igény van [7].

A ráksejtek számára szelekciós előnyt jelent, hogy genomjuk instabil ezért az újabb és újabb mutációk következtében folyamatosan változik. Ennek a tumor evolúcióként is

ismert jelenségnek köszönhetően a kialakult daganatokban található ráksejtek genomja is heterogén [8]. A heterogén sejtpopuláció, a környezeti tényezőkhöz igazodó, adekvát genetikai és epigenetikai módosítások, a túltermelő multidrog-rezisztens fehérjék és a feltételezett daganat-össejtek [9] együttesen növelik a tumorok ellenálló képességét. Ezen jellemzők a gyógyszeres terápiával szembeni rezisztenciához vezetnek [10]. A legbiztosabb mód a rezisztencia kialakulásának megelőzésére, illetve a rák gyógyítására, ha a kezelés során az összes daganatsejt mielőbbi elpusztítására törekszünk. Ezt az ideális célt kizárólag jelátviteli terápiával még nem lehet elérni. Ezért a gyógyszeres kezelést (és/vagy sebészeti eltávolítást) túlélő tumor sejtekből idővel kiújuló daganatok esetében a biomarkerek felülvizsgálatára és ehhez igazodó újabb kezelési stratégia felállítására van szükség [11].

A jelátviteli terápia során az ideális célt a lehető legtöbb daganat-specifikus jelátviteli út egyidejű gátlásával lehet megközelíteni. Ennek megvalósítása több támadáspontú gátlószerekkel, vagy szelektív gátlószerek racionális kombinálásával történhet [10]. Ez az alapja az úgynevezett kombinációs jelátviteli terápiának, ami preklinikai kísérletek eredményei alapján szinergista hatást, dózisredukciót, a rezisztencia kialakulásának megelőzését, illetve akár a daganatsejt-populáció teljes pusztulását is eredményezheti [12, 11].

A kombinációs jelátviteli terápia klinikai bevezetését azonban több tényező korlátozza. Egyrészt az onkogén fehérjéknek csak kis hányadára létezik gátlószer, a hibás tumor szupresszor fehérjék pótlására pedig még nincs terápia. Másrészt számos tumor esetében nem lehet egyértelműen azonosítani a rendellenes sejtfunkció okát jelentő molekuláris célpontokat, vagy driver géneket [13]. Vannak továbbá olyan molekuláris célpontok (például a c-Met) melyek gátlására az egészséges sejtek is érzékenyek. Ez az úgynevezett „*on-target*” toxicitás [14]. Mindazonáltal az alkalmazható gátlószerek többsége több támadáspontú („*multi-target inhibitor*”), ezért számos nem-célpont fehérjét is gátolhatnak. Ebből adódik az úgynevezett „*off-target*” toxicitás, ami már monoterápiában is sok mellékhatást okoz. Egy további probléma, hogy a gátlószerek kombinálása következtében számolni kell az esetleges gyógyszer-interakciókkal és a szinergista jelátvitel gátláshoz társuló bizonytalan és egyedi mellékhatásokkal is [15]. Mindemellett a racionális hatóanyag-kombinációk kiválasztásához elengedhetetlen a prediktív markerek komplex értelmezése is, amihez az intracelluláris jelátviteli folyamatok hálózatszerű és azt dinamikus rendszerként kezelő ismerete szükséges. Ez lehetővé teszi a rendellenes sejtfunkció okát képező és az adott ráktípus számára

legérzékenyebb jelátviteli pontok azonosítását, megkülönböztetve ezeket az okozatként rendellenesen működő fehérjétől. Bár a molekuláris hálózatok modellezése már ma is nagy segítséget nyújt a hatóanyag-fejlesztésben, az erre alapozó kombinációs terápiához további ismeretek és eredmények szükségesek [16].

A klinikai relevanciával rendelkező jelátvitelt gátló hatóanyagoknak jelenleg két alapvető típusa létezik, a kismolekulás vegyületek, illetve az antitestek. A jövőben számítani lehet RNS, peptid, illetve fehérje alapú hatóanyagok kifejlesztésére is, azonban ezen vegyületek daganatsejtekbe történő hatékony bejuttatása még gondot okoz [11]. A különféle daganatellenes hatóanyagok hatékony és célzott bejuttatására, ezáltal az *on-* és *off-target* toxicitás visszaszorítására, a hatóanyag-szállító rendszerek ígéretes lehetőségeket tartogatnak [17].

2.4 Proteinkináz-gátlók

A proteinkinázok kulcsfontosságú szerepet töltenek be a sejten belüli jelátviteli folyamatokban. Részt vesznek a sejtek növekedésének, migrációjának, differenciálódásának, anyagcseréjének, túlélésének szabályozásában. Szabálytalan működésük oka lehet genetikai eredetű, vagy ettől független fokozott expresszió, melyek a daganatos megbetegedéseken kívül számos további patológias állapotban, például fertőző betegségekből és gyulladásos folyamatokban is alapvető szerepet játszanak. Széleskörű élettani szerepükből kifolyólag napjainkban a jelátviteli terápia egyik legjelentősebb célpontjai [18].

Foszforilációs hely alapján megkülönböztetünk szerin/treonin-, illetve tirozin kinázokat. Az 518 ismert humán proteinkináz közül 90 tirozin, és 43 tirozin kináz-szerű proteinkináz [19]. A jelenleg klinikumban alkalmazott kismolekulás inhibitorok többsége tirozin kinázok gátlásán keresztül fejti ki hatását [20]. Lokalizáció alapján 58 receptor és 32 nem-receptor tirozin kinázt különböztetünk meg.

A tirozin kinázok a sejtmembránban helyezkednek el és extracelluláris ligandkötő, transzmembrán és intracelluláris kináz doménnel rendelkeznek. A nem-receptor tirozin kinázok a citoplazmában vagy a sejtmagban helyezkednek el, de a sejtmembrán belső felszínéhez is kapcsolódhatnak [21].

A tirozin kinázok közös jellemzője, hogy az evolúciósan konzerválódott szerkezetű ATP-kötőzsebük lefoglalásával hatékonyan gátolhatóak [22]. A szerkezeti hasonlóság miatt, a tirozin kinázok szelektív gátlása ATP-kompetitív vegyületekkel általános

problémát jelent. A szelektivitás növelésére az ATP-kötőzsebből nyíló hidrofób régiók egyedi szerkezete ad lehetőséget (1. ábra) [23].

A kinázgátlók gyógyszerre történő fejlesztése során a hatékonyság mellett a szelektivitás egy kulcsfontosságú szempont, amit alapvetően a célfehérjéhez történő kötődés jellege határoz meg [24]. A kinázgátlókat Robert Rokoski Jr. munkája nyomán, a célfehérje-hatóanyag komplex szerkezete szerint csoportosíthatjuk [20]:

Az I típus a „DFG-Asp in” aktív fehérje szerkezetéhez kötődik.

Az I $\frac{1}{2}$. típus a „DFG-Asp in” inaktív fehérje szerkezetéhez kötődik.

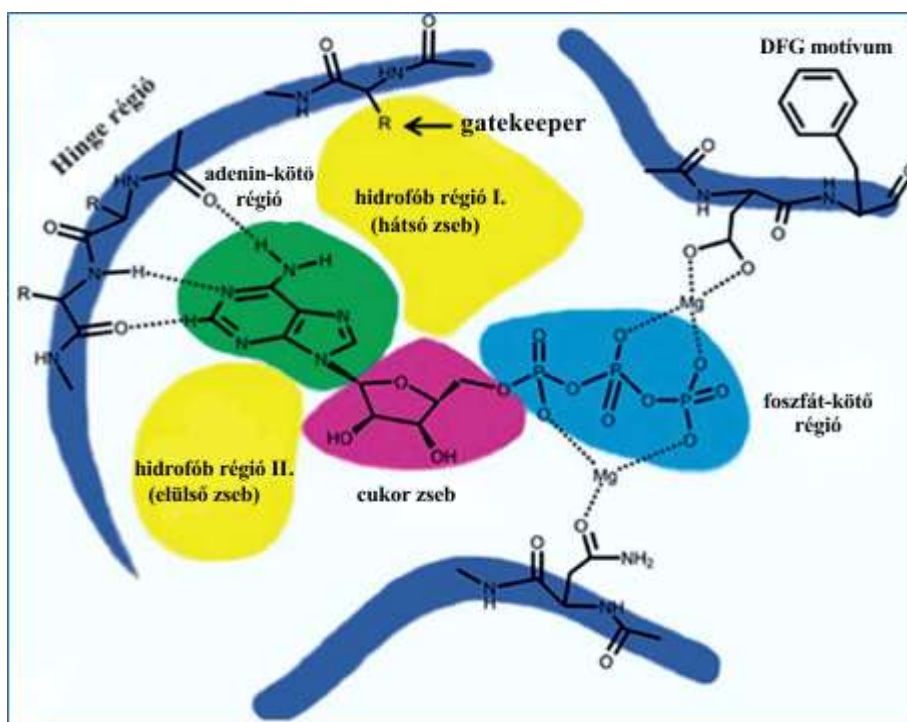
A II. típus a „DFG-Asp out” inaktív fehérje szerkezetéhez kötődik.

A III. típusú gátlószer az ATP-kötőzseb mellé kapcsolódik.

A IV. típus az ATP-kötőzsebtől távolabb kötődik.

Az V. típus a fehérje kináz doménjének két eltérő régiójához kötődik, ezért bivalens gátlószernek tekinthető.

A VI. típusba soroljuk az irreverzibilis gátlószereket, melyek kovalens kötést létesítenek a célfehérjével.



1. ábra: A proteinkinázok ATP-kötőzsebének általános szerkezete [25]

Az I., I $\frac{1}{2}$. és II. típusok az adenin-kötőzsebet foglalják el, hidrogén-híd kötással kapcsolódva a Hinge régióhoz (1. ábra). Ezen típusok a kötődési idő szerint további A és B alcsoportokba sorolhatóak. A III. és a IV. típusba az allosztérikus gátlószerek tartoznak, melyeket nagyobb szelektivitás jellemez, mint az ATP-kompetitív vegyületeket [20].

A kinázgátlókat eleinte nagy áteresztőképességű vizsgálatokkal választották ki nagyszámú vegyülettárakból. Ez a megközelítés sok ATP-kompetitív hatóanyagot eredményezett. Az újabb hatóanyag-fejlesztési stratégiák egyike a már korábbi gátlószerek szerkezetére alapozó analóg szintézis. Ezzel elsősorban a kötődési erősség, a szelektivitás és a farmakokinetikai paraméterek befolyásolhatóak. Egy további lehetőség a szerkezet alapú fejlesztés, ami a potenciális kötőhely térszerkezetét figyelembe véve a gátlószerekkel kialakítható interakciókra, és az így kiváltható hatás közötti összefüggésekre fókuszál. Ez lehetőséget nyújt egyedi szerkezetű hatóanyagok virtuális, *in silico* fejlesztésére és szűrésére, azonban ismerni kell az adott kötőhely szerkezetét. Ez esetben tovább bonyolítja a helyzetet, hogy a fehérjék sokféle egyedi szerkezetet képesek felvenni. Egy harmadik korszerű megközelítés a fragmens-alapú fejlesztés. Ebben az esetben először kis molekulatömegű, de az ismert biológiai célponthoz már gyengén kötődni képes vegyületeket válogatnak ki. Következő lépésben röntgenkrisztallográfiával megvizsgálják a vegyülettel kapcsolatot létesítő fehérjerégió egyedi térszerkezetét, és ennek ismeretében fejlesztik ki a nagyobb affinitású hatóanyag analógokat. Ennek a módszernek számos előnye van, de a kiindulási, kis affinitású vegyületek kiszűrése jelenleg komoly technológiai kihívást jelent [26].

A biológiailag aktív hatóanyag-jelöltek továbbfejlesztése során az abszorpció, disztribúció, metabolizáció, exkréció és toxicitás (röviden: ADMET) optimalizálása kulcsfontosságú a további *in vivo* kísérletekhez [27]. A kinázgátlók fejlesztése idő- és költségigényes folyamat, ráadásul a klinikai fázisok számos további buktatót rejtnek [28]. Ennek bizonyítéka, hogy a nagyszámú hatásos vegyület közül, csak igen kevés jut klinikai fázisba és a nagy erőfeszítések ellenére is klinikai alkalmazásra jelenleg alig több, mint 30 kinázgátló kapott hatásági engedélyt [29].

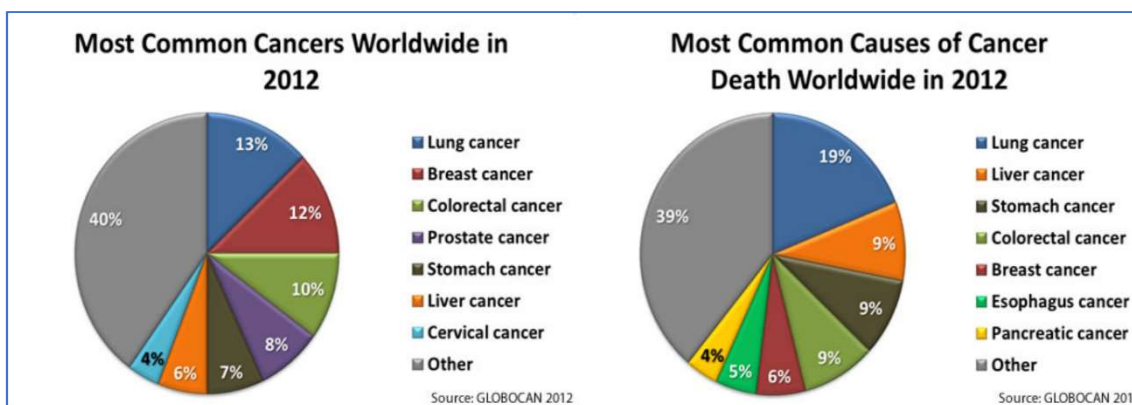
A jelenleg forgalomban lévő gátlószerek többsége ATP-kötőhelyet ismer fel. Ez egyrészt előnyös, mert szerencsés esetben egyes „*off-target*” kinázok gátlása fokozhatja a daganatellenes hatást, ami nagyobb garanciát biztosít a „*multi-target*” inhibitorok hatékonyságára [30, 31]. Másrészt azonban a korlátozott szelektivitás számos mellékhatást eredményez, és további problémát okoz azzal, hogy a több jelátviteli pont gátlásából eredő bizonytalan hatásmechanizmus megnehezíti a kísérletek és kezelések során kapott eredmények molekuláris hátterének pontos megértését [32, 5].

PhD kutatómunkám szempontjából lényeges jelenség, hogy a bázikus karakterű kismolekulás inhibitorok hatékonyságát csökkentheti még spontán dúsulásuk és csapdázódásuk a sejtplazmához képest savasabb lizoszómában [33]. Ezt a folyamatot az

imatinib és nilotinib esetében hiperspektrum stimulált Raman hasításos mikroszkóppal sikerült igazolni, ami több nagyságrenddel magasabb hatóanyag-koncentrációt mutatott a lizoszómában a citoplazmához képest. [34].

2.5 Crizotinib jelentősége a daganatterápiában

A tüdőrák nemzetközi viszonylatban mind esetszám, mind pedig halálozás tekintetében vezető helyen áll (2. ábra). Előfordulása férfiak körében gyakoribb [35].



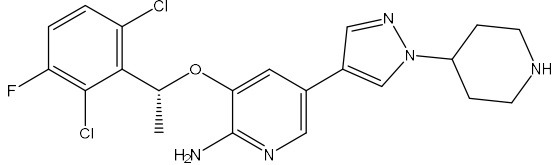
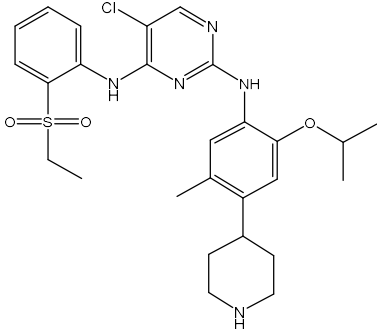
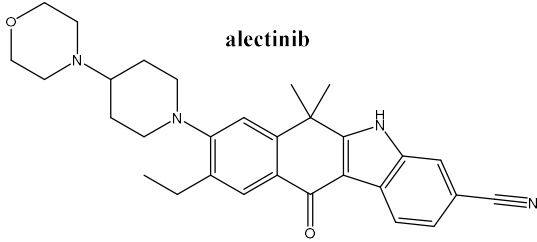
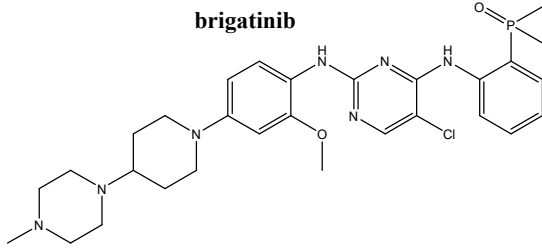
2. ábra: A rákos megbetegedések statisztikai adatai nemzetközi szinten, 2012-ben. (Forrás: Globocan 2012.)

A tüdőrákos esetek körülbelül 85%-a a nem-kissejtes tüdőrákok (NSCLC) csoportjába sorolható, a másik csoportot a kissejtes tüdőrákok alkotják [36]. A nem-kissejtes tüdőrákon belül az EML4/ALK transzlokáció 3-7%-ban van jelen. Ez évente, globálisan, megközelítőleg 60 ezer új ALK-pozitív esetet jelent, ígéretes célpontot teremtve a hatóanyag-fejlesztés számára [37].

A crizotinib a jelátviteli terápiás hatóanyagok közé sorolható, ismert molekuláris célpontjai az ALK, c-Met (HGFR), ROS1 és RON (MST1R) receptor tirozin kinázok (I. táblázat). A gyógyszert a Pfizer fejlesztette ki és forgalmazza, Xalkori[®] márkaneven. Az FDA 2011-ben engedélyezte a crizotinib alkalmazását előrehaladott stádiumú, vagy áttétes nem-kissejtes tüdőrákok esetén, melyekben az *ALK* gén mutáció kimutatható [38]. 2016 márciusában az FDA kiterjesztette a crizotinib használatát előrehaladott, ROS1-pozitív nem-kissejtes tüdőrákokra is [39].

Az ALK pozitív NSCLC, mint terápiás célpont jelentőségét bizonyítja, hogy a crizotinib 2011-es engedélyezését 2014-ben a ceritinib követte, majd 2015-ben az alectinib és 2017-ben pedig a brigatinib. Ezek a hatóanyagok egyaránt az ATP-kompetitív gátlók közé tartoznak és az ALK fehérjén kívül egyéb molekuláris célpontokkal is rendelkeznek (I. táblázat) [29].

I. táblázat: FDA engedéllyel rendelkező ALK gátlók 2017-ben.

hatóanyag	gyártó	inhibitor típus	ismert célpontok
crizotinib 	Pfizer, 2011	I I½B	ALK c-Met ROS1 MST1R
ceritinib 	Novartis 2014	I	ALK IGF-1R InsR ROS1
alectinib 	HOFFMAN- LA ROCHE 2015	I½B IIB	ALK RET
brigatinib 	Ariad 2017	I½B IIB	ALK ROS1 IGF-1R Flt3 EGFR

2.5.1 Molekuláris célpontok

ALK

Az anaplasztikus limfóma kináz (ALK) egy receptor tirozin kináz, ami az inzulin receptorok családjába tartozik és az *ALK* gén kódolja. Azonosított potenciális ligandumjai a pleiotropin [40], neurit növekedés-serkentő faktor 2 (NEGF2) [41] és heparin [42]. Az ALK fiziológiás szerepe emberben még nem pontosan ismert. *ALK* génkiütött egerek

agyműködésben eltéréseket mutattak ki, de életképességükben jelentős hátrányt nem tapasztaltak [43].

Az ALK rendellenes működésének egyik okát a különféle pontmutációk képezik. Az ALK mutációit a neuroblastomák 8%-ában azonosították. A crizotinibbel történő kezelés azonban csak bizonyos mutációk esetén, az esetek kis hányadában bizonyult hatásosnak. Következésképp az ALK mutáns neuroblasztómás betegek esetében az ALK gátlók klinikai alkalmazásához még további ismeretek szükségesek [44].

Az ALK rendellenes működésének másik ismert oka az ALK különböző fehérjékkel történő fúziója, ami kromoszóma-átrendeződés következtében jöhet létre. Az *ALK* gén transzlokációit anaplasztikus nagysejtes limfómák 55%-ában és gyulladásos fibroblaszt daganatok 50%-ában azonosították. A crizotinib klinikai relevanciájának vizsgálata ezen ráktípusok esetén folyamatban van [45]. Az NSCLC betegek 3-7%-ában mutatható ki *ALK* átrendeződés, ezek közül leggyakoribb az *EML4/ALK* fúzió. A különféleképp fuzionált onkogén variánsok közös jellemzője, hogy tartalmazzák az ALK tirozin kináz domént, illetve az *EML4* promotor régióját és az *EML4* oligomerizációs doménjét. Ennek következménye folyamatos fehérje expresszió és ligandum-független dimerizáció, ami fokozottan aktív ALK indukált jelátvitelt generál [45].

Az ALK-transzlokáció előfordulása a fiatalabb, nem-dohányzó betegek körében gyakoribb. További jellegzetessége az ALK transzlokációnak, hogy ritkán társulnak hozzá más ismert onkogének, mint például az EGFR vagy KRAS [46]. Ezért az ALK transzlokáció egy jó prediktív biomarkernek tekinthető. Ennek köszönhető, hogy a crizotinib szelektált betegcsoport esetén relatív magas, 65%-os arányban bizonyult hatékonynak és piaci forgalomba került [47].

ROS1

A ROS1 receptor tirozin kináz szerkezetileg hasonló az ALK-hoz és a *ROS1* gén kódolja. A fehérje az inzulin receptorok családjához tartozik, Fiziológiai körülmények között több szervben is expresszáldódik [48]. Számos jelátviteli utat aktiválhat, melyek a sejtek differenciálódásában, osztódásában, növekedésében és túlélésében játszanak szerepet. Pontos funkciója az emberi szervezetben azonban még kevésbé ismert és ligandumját sem sikerült azonosítani [49].

Az *ALK*-hoz hasonló módon, a *ROS-1* szintén több különböző génnel fuzionálhat és hasonló módon válhat onkogénné [50]. Jelenleg az egyetlen klinikai relevanciával rendelkező ROS1 pozitív daganattípus a nem-kissejtes tüdőrák, amin belül előfordulása

körülbelül 2% [49]. A ROS1 rendellenes működését kromoszóma átrendeződéstől független esetekben is megfigyelték, azonban ezek terápiás jelentősége még nem tisztázott [51].

Az ALK-hoz hasonló módon a ROS1 átrendeződéshez is ritkán társulnak további driver onkogének és a betegek többnyire fiatalabb, nem-dohányzó betegek [52]. A klinikumban engedélyezett ROS1 gátlószer jelenleg a crizotinib.

c-Met

A c-Met (MET), vagy más néven hepatocita növekedési faktor receptor (HGFR), a *c-Met* gén által kódolt receptor tirozin kináz. Ligandumja a hepatocita növekedési faktor (HGF), melyet a mezenchimális sejtek termelnek. A c-Met jelátvitelét bonyolult kapcsolatrendszer jellemzi. Fiziológiás körülmények között számos szerv (máj, hasnyálmirigy, prosztata, vese, izom- és csontvelő) hámsejteiben expresszálódik és működése erősen szabályozott. Létfontosságú szerepe van az embrionális fejlődésben, a normál szöveti mintázat fenntartásában és a sebgyógyulásban. Szabályozza a sejtek osztódását és túlélését, de hatással van a sejtek motilitására és inváziójára is. Jelentős szerepét igazolták őssejtekben, illetve a feltételezett daganat-őssejtekben is [53].

A c-Met kóros működésének hátterében állhatnak a c-Met genetikai rendellenességei, de igen gyakran fordul elő a génamplifikáció nélküli fokozott transzkripció, vagy autokrin/parakrin stimulusok [54]. A c-Met fokozott expresszióját számos rosszindulatú tumor típusban azonosították (pl.: mell-, bél-, tüdő-, hasnyálmirigy-, máj- és petefészekrák) melyekre jellemző volt az invazív fenotípus és az igen rossz prognózis [55]. Sajnos a c-Met fehérje gátlására, mint elsődleges molekuláris célpontra egyelőre nincs klinikai terápia. Ennek legalapvetőbb oka, hogy a fokozott c-Met expresszió alapján válogatott betegek nagy százalékánál a c-Met-gátlók nem bizonyultak hatásosnak [56]. A legújabb kutatások alapján a potenciálisan *c-Met* onkogén addikciót okozó mutációk előfordulása a nem-kissejtes tüdőrákokban viszonylag ritka, körülbelül 3-4% [57]. Azonban a tüdőrák magas esetszáma miatt ez így is közel 50 ezer beteget érint évente. Ennek ellenére kizárólag c-Met-gátlás céljából egyelőre a crizotinib sem alkalmazható.

A c-Met-gátlók klinikai engedélyezésére tett sikertelen próbálkozásoknak több oka is van. Egyrészt a c-Met gyakrabban vizsgált, fokozott expresszióját az esetek többségében más onkogének okozzák, ilyenkor a c-Met rendellenes működése csak következmény, azaz másodlagos esemény [54]. Egy másik fontos tényező a c-Met

számos jelátviteli partnere és egyéb kinázokkal történő heterodimerizációja, melyeket különféle rezisztencia mechanizmusokkal is összefüggésbe hoztak. Ezen a tulajdonságok miatt gyakran előfordul, hogy a c-Met-gátlást alternatív jelátviteli utakon keresztül, redundáns módon megkerülik a ráksejtek [58]. Mindazonáltal a fokozott c-Met expresszió is okozhatja egyéb kezelőszerekkel, például a gyakran alkalmazott EGFR gátlókkal szembeni rezisztencia kialakulását. Ilyen esetekben az érzéketlenné vált jelátviteli célpont és a c-Met kombinált gátlására a daganatok újra érzékenyen reagálnak, és szinergista hatás tapasztalható [59]. Ezért a kezdeti kudarcok ellenére a c-Met-gátlók továbbra is intenzíven kutatott vegyületek, melyek kombinációs terápiában különösen eredményesek lehetnek [60].

Azonban még a szelektív c-Met-gátlók esetén sem kerülhető el az az alapvető probléma, hogy a c-Met-gátlásra az egészséges sejtek is érzékenyen reagálnak. Az ebből fakadó *on-target* toxicitás súlyos mellékhatásokat eredményezhet [61]. Mivel a c-Met nagyon fontos molekuláris célpont a daganatterápiában, ezért a toxikus c-Met-gátlók célzott bejuttatása a ráksejtekbe különösen indokolt és ígéretes megoldás lehet. Ez a megállapítás egyúttal PhD kutatómunkám témaválasztásában is meghatározó jelentőséggel bír.

RON

A RON, vagy más néven makrofág-stimuláló-1 receptor (MST1R) szerkezetileg rokon a c-Met kinázzal, de annál kevésbé ismert. Fiziológiás környezetben, kis mennyiségben főként a hámsejtekben expresszálódik, de csekély mértékben egyéb szervekben is kimutatható. A RON létfontosságú az embrionális fejlődés során. Ligandumja a makrofág stimuláló fehérje (MSP), vagy más néven HGFL [62]. A RON aktivációját követően homodimert, vagy különféle receptor tirozin kinázokkal (c-Met, EGFR, IGF1R) heterodimert képezhet. A heterodimerizáció mindkét kináz számára kölcsönösen előnyös lehet. Egymást aktiválni képesek, ezáltal az egyik kináz gátlása a partneren keresztül megkerülhető, sok esetben ezek potenciális rezisztencia mechanizmusok lehetnek [63].

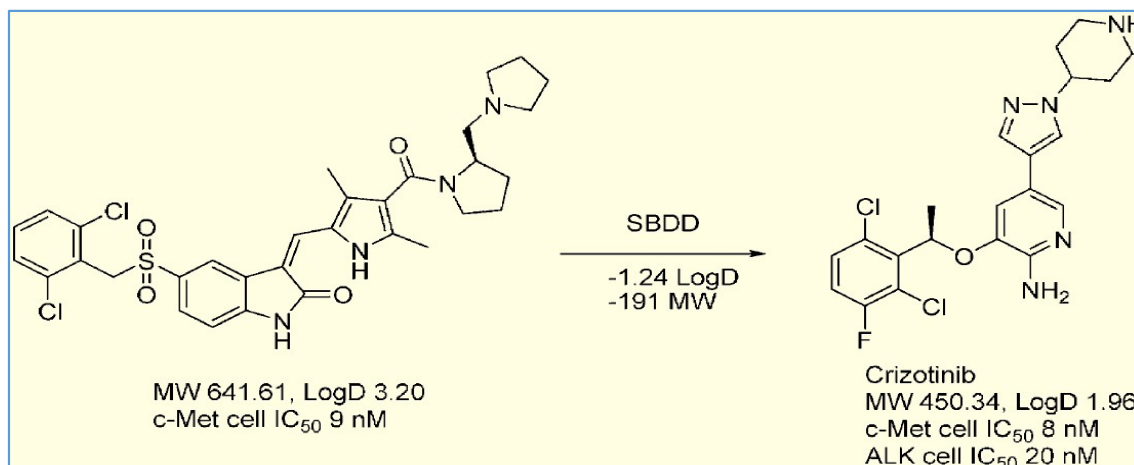
A RON fokozott expresszióját, mint fontos prediktív biomarkert, számos ráktípusban kimutatták. Ezek a daganatok nagy hasonlóságot mutatnak a c-Met pozitív tumorokkal, jellemző rájuk az áttétképzési hajlam és a rossz prognózis [62].

A RON és a c-Met szoros kapcsolatban állnak, daganatsejtekben gyakran koexpresszálódnak és egymással dimerizálódhatnak. A RON szerepet játszik a c-Met

jelátvitel erősítésében és a c-Met-gátlással szembeni rezisztencia egyik okozója is lehet. Ez fordítva is igaz, tehát a RON gátlását a c-Met is képes kompenzálni. További érdekesség, hogy a két fehérje közötti szerkezeti hasonlóság miatt a legtöbb c-Met-gátló, mint például a crizotinib, gátolja a RON-t is. [64, 65].

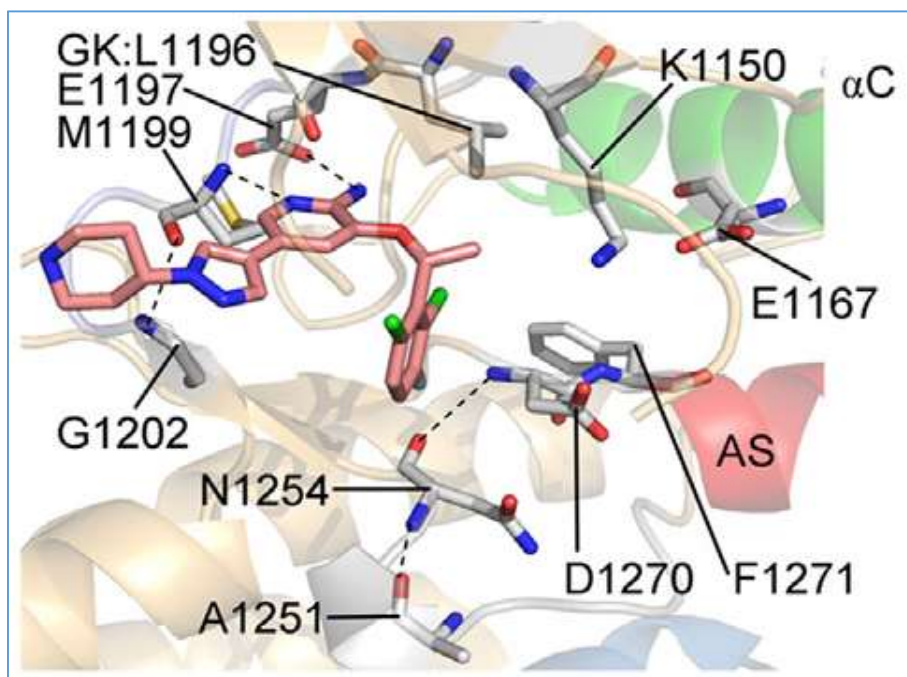
2.5.2 Kémiai szerkezet, szerkezet-hatás összefüggés

A crizotinibet eredetileg c-Met-inhibitornak fejlesztették. A kémiai szerkezet megtervezéséhez egy preklinikai kísérletekben használatos, szelektív gátlószer (PHA-665752) c-Met fehérjével alkotott komplexének egyedi szerkezetét vették alapul. Ehhez a szerkezethez egy új 5-aryl-3-benziloxi-2-aminopiridin alapvázat terveztek. A szerkezet-optimalás során a legjobb vegyületnek a crizotinib bizonyult, melynek két enantiomerje közül az R-konfiguráció a hatásosabb, amelyet a 3. ábra mutat be [66].

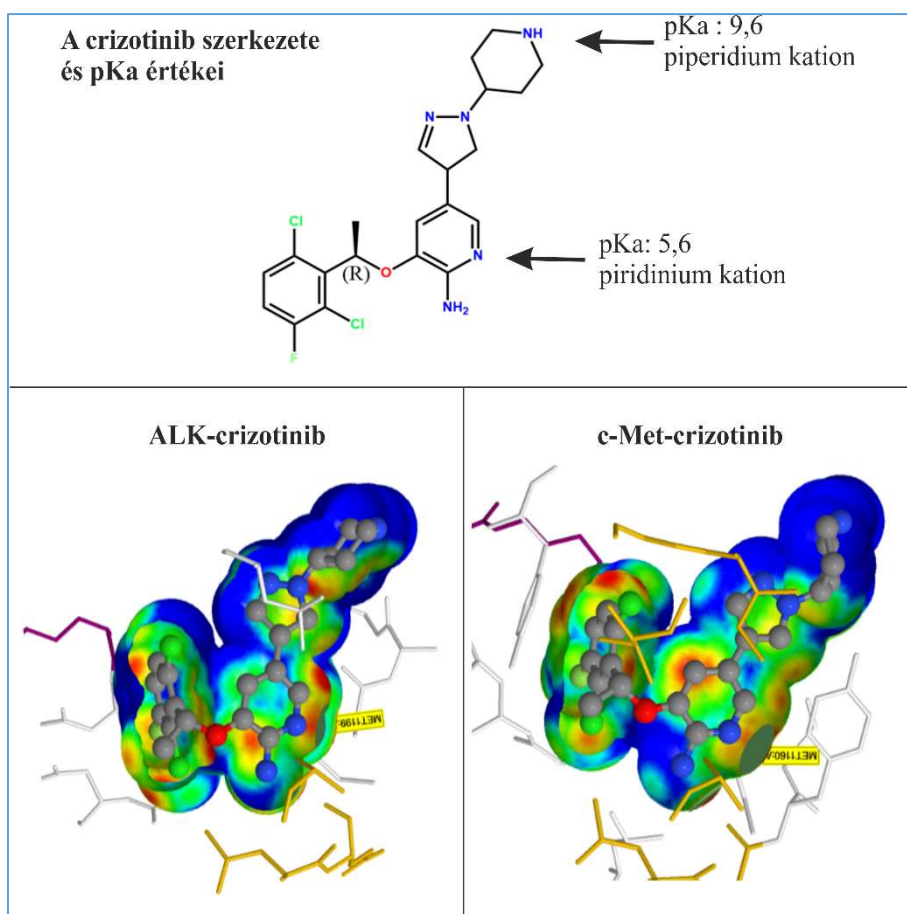


3. ábra: A PHA-665752 és a crizotinib szerkezete.

A crizotinib klinikai bevezetését azonban nem c-Met, hanem ALK gátló hatása indokolta. Ennek eredményeképp a crizotinibbel folytatott további kutatások és a publikációk is az ALK irányába tolódtak el. Az ALK fehérjéhez történő kötődése alapján a crizotinib az I. és az I½B típusú gátlószerek csoportjába sorolható és erre jellemző módon szorosan illeszkedik, és kötődik a Hinge régióhoz. A Hinge régióban található E1197 karbonilcsoportjával a piridin kettes helyzetű aminocsoportja, az M1199 aminocsoportjával pedig a piridin nitrogénatomja létesít hidrogénhíd-kötést. Ebben a helyzetben az M1199 egy további hidrogénhíd-kötéssel tud kapcsolódni a G1202-vel. A 2,6-diklór-3-fluorofenil gyűrű a hidrofób régió elülső FP-I zsebével („front pocket I”) létesít hidrofób kapcsolatot (4. ábra) [20].



4. ábra: A crizotinib kötődése az ALK fehérjéhez (GK: gatekeeper. AS: aktivációs szegmens).



5. ábra: A crizotinib szerkezete és az ALK és c-Met kinázokkal alkotott komplexe. (Kép forrása: RCSB PDB [67]: ALK: 2XP2; c-Met: 2WGJ)

A crizotinib-célkináz komplexek szerkezetére általánosan jellemző, hogy a crizotinib hidrofób része a kötőzsebben helyezkedik el, hidrofíli része pedig a kötőzsebből kifelé áll (4. és 5. ábra). A crizotinibben található piperidin bázikus, a piperidinium kation pK_a értéke 9,6. A vegyület ezen, hidrofíli részének szerepe inkább farmakokinetikai, mint farmakodinámiás. Másrészt a piperidin nitrogénatomja egy reakcióképes nukleofil funkció csoport. A crizotinib kötődését az ATP-kötőzsebbhez alapvetően a 2-aminopiridin alapváz eredményezi. A 2-aminopiridin kevésbé bázikus, a piridinium kation pK_a értéke 5,6, továbbá aromás aminocsoportja kevésbé reakcióképes nukleofil ágens. A crizotinib szerkezeti tulajdonságai alapján, egy adott hatóanyag-szállító vegyülethez történő kémiai kapcsolást a piperidin gyűrűn keresztül célszerű megvalósítani.

2.5.3 Klinikai tapasztalatok, hatás, mellékhatás és rezisztencia

A klinikai eredmények alapján, a platina alapú kemoterápiás kezelésen már átesett, előrehaladott stádiumú ALK pozitív NSCLC betegek esetében; az orálisan napi kétszer 250 mg dózisban alkalmazott crizotinib hatásosabbnak bizonyult, mint a kemoterápiás szernek minősülő pemetrexed vagy docetaxel. Az átlagos progressziómentes túlélés a crizotinib esetén 7,7 hónap, a hagyományos kemoterápiás kezelést kapott csoport esetében 3,0 hónap. A kezeléssel szemben mutatott válaszarány 65% a crizotinib, 20% a kemoterápiás kontroll esetében. Az átlagos túlélés a crizotinib esetén azonban csak 20,3 hónap. Ez kevesebb, mint a kemoterápiás betegcsoport esetén tapasztalt 22,8 hónap. A statisztikai adatok alapján, a kemoterápiához hasonló módon a crizotinib is sok gyakori és több súlyos mellékhatással rendelkezik. A crizotinib klinikai vizsgálataiban jelentett mellékhatásait a II. táblázat foglalja össze [68].

Fontos különbség azonban, hogy a kemoterápiához képest a crizotinib kezelés során a betegek az életminőségük fokozottabb javulásáról számoltak be [47]. A későbbi klinikai vizsgálatok alapján a crizotinib, mint első vonalbeli kezelőszer, korábban nem kezelt betegcsoport esetén is hatásosabbnak bizonyult a hagyományos kemoterápiához képest [69].

II. táblázat: A crizotinib mellékhatásai (N = 1722).

A crizotinib klinikai vizsgálataiban jelentett mellékhatások (n = 1722)			
Szervrendszer	Nagyon gyakori	Gyakori	Nem gyakori
Vérképzőszervi és nyirokrendszeri betegségek és tünetek	Neutropénia (22%) Vérszegénység(15%) Leukopénia (15%)		
Anyagcsere- és táplálkozási betegségek és tünetek	Csökkent étvágy (30%)	Hypophosphataemia (6%)	
Idegrendszeri betegségek és tünetek	Neuropátia (25%) Ízérzés zavara (21%)		
Szembetegségek és szemészeti tünetek	Látászavar (63%)		
Szívbetegségek és a szívvel kapcsolatos tünetek	Szédülés (26%) Bradycardia (13%)	Szívelégtelenség (1%) QT-szakasz megnyúlás (4%) Ájulás (3%)	
Légzőrendszeri, mellkasi és mediastinalis betegségek és tünetek		Interstitialis tüdőbetegség (3%)	
Emésztőrendszeri betegségek és tünetek	Hányás (51%) Hasmenés (54%) Hányinger (57%) Székrekedés (43%) Hasi fájdalom (21%)	Oesophagitis (2%) Dyspepsia (8%)	Gastrointesztinális perforáció (<1%)
Máj- és epebetegségek, illetve tünetek	A transzaminázok szintjének emelkedése (32%)	Az alkalikusfoszfataz vérszintjének emelkedése (7%)	Májelégtelenség (<1%)
A bőr és a bőr alatti szövet betegségei és tünetei	Kiütés (13%)		
Vese- és húgyúti betegségek és tünetek		Veseciszta (3%) A vér kreatininszintjének emelkedése (8%)	Akut veseelégtelenség (<1%) Veseelégtelenség (<1%)
Általános tünetek, az alkalmazás helyén fellépő reakciók	Ödéma (47%) Fáradtság (30%)		
Laboratóriumi és egyéb vizsgálatok eredményei		Csökkent tesztoszteronszint a vérben (2%)	

A klinikai eredmények alapján megállapítható, hogy az ALK, illetve ROS1 pozitív nem-kissejtes tüdő tumorok a crizotinibre kezdetben többnyire jól reagálnak. Az ennek ellenére tapasztalt rövidebb túlélés hátterében állhat, hogy a rezisztencia hamar, általában

1-2 éven belül kialakul [70]. A rezisztencia kialakulását az esetek negyedében az *ALK*, illetve a *ROS1* fúziós gén másodlagos mutációja és amplifikációja okozza. A rezisztencia egy másik oka az alternatív jelátviteli utak aktiválódása lehet. Új onkogén driver lehet például az EGFR, a c-KIT és a RAS. A feltételezések szerint azonban, az esetek többségében a daganat kiújulásának hátterében a tumor-heterogenitás, a kis számban jelenlévő és az adott kezeléssel szemben ellenálló sejtek jelenléte áll [71]. További érdekes eredmény, hogy egyes betegekből származó crizotinib-rezisztenssé vált daganatsejtek *in vitro* továbbra is érzékenyek maradtak a crizotinibbel szemben. Ennek lehetséges magyarázata, hogy ezekben a tumorokban a crizotinib koncentrációja *in vivo* nem volt képes a szükséges terápiás szint elérésére [72].

A következő generációs ALK gátlók sok esetben a crizotinib rezisztencia kialakulása után is hatásosnak bizonyulnak. A ceritinib például kizárólag a crizotinib rezisztencia esetén alkalmazható hatóanyag, mely a legtöbb crizotinib rezisztenciát okozó mutáció ellenére is hatásos, ugyanakkor egy nagyságrenddel hatékonyabb gátlószere az ALK-nak, mint a crizotinib [72]. Alkalmazásának hátránya, hogy a crizotinibnél is több mellékhatása van [73].

2.6 Célzott hatóanyag-szállító rendszerek a daganatterápiában

A szolid tumorok gyógyszeres kezelése során, terápiás jelentőséggel bíró hatóanyag koncentrációt elérni és azt a szükséges ideig fenntartani komoly kihívást jelent. A hatóanyag számára nehezen átjárható és heterogén ráksejt-populációt tartalmazó szolid daganatokban még a hosszantartó kezelés ellenére is maradhatnak életképes ráksejtek, ami az ellenállóbb sejtek szelekcióját indukálja [74]. A daganatellenes hatóanyagok, így a kinázgátlók koncentráció növelésének is az egyre súlyosabb mellékhatások szabnak határt. Bár a kinázgátlók racionális kombinációja szinergista hatást és dózisredukciót eredményezhet [11], a kombinált alkalmazásukat megnehezíti, hogy több jelátviteli pont egyidejű gátlása az egészséges sejtekre is toxikus lehet [75], nem is beszélve az esetleges gyógyszer-interakciókról [15].

A klasszikus citotoxikus szerek és a korszerűbb kinázgátlók, így a crizotinib esetében is fennáll az igény a terápiás hatékonyság növelésére és a mellékhatások csökkentésére. Számos további olyan vegyület létezik, ami rossz farmakokinetikai jellemzői miatt *in vivo* nem képes a megfelelő módon és a szükséges mennyiségben eljutni molekuláris célpontjához. A felsorolt problémák áthidalására a célspecifikus hatóanyag-szállító

rendszerek nyújtanak kézenfekvő megoldást, amelyek robbanásszerű elterjedése figyelhető meg napainkban. Az egyedi farmakokinetikai előnyök miatt, a hatóanyag-szállító rendszerek átformálják a klasszikus hatóanyag-fejlesztési szabályokat, stratégiákat is [76].

A daganatellenes hatóanyag-szállító rendszerek feladata, hogy a hozzájuk kapcsolt hatóanyagot, szelektíven juttassák be a daganatokba, az egészséges szövetekre kifejtett káros hatások nélkül. Erre az egészséges és a ráksejtek közötti eltérések adnak lehetőséget.

A nanotechnológia fejlődése számos nanorészecske, mint hatóanyag-szállító rendszer terápiás alkalmazását vetette fel. A nanorészecskék viselkedése biológiai rendszerekben jelentősen eltér a mikro- és makrorészecskéktől. Ez számos előnnyel járhat, ilyen a jobb oldhatóság, a nagyobb permeabilitás, fokozottabb stabilitás és a szabályozott hatóanyag-leadás. Irányított hatóanyag-leadásukat hozzájuk kapcsolt célzó ágensekkel (pl. antitestek, aptamerek) is lehet fokozni. A nanoméret azonban hátrányokkal is járhat. Egyes nanorendszerek esetében gondot okozhat a szervezetből történő kiürülés, mások nem kívánatos immunreakciót válthatnak ki. Ilyen immunválasz a komplement-aktivációs pszeudoallergia (CARPA), mely akár végzetes kimenetelű anafilaxiás sokkot is eredményezhet [77].

A hatóanyag-szállító rendszerek egyik ígéretes csoportját a peptid alapú vegyületek alkotják. Daganatterápiás jelentőséggel bírnak az arginin-glicin-aszparaginsav (RGD) szekvenciát tartalmazó peptidek, a szomatosztatin-, a bombesztin-, az angiopeptin-2 és a GnRH analógok [78]. Közös előnyük, hogy hatóanyag-szállító és célspecifikus irányító ágensek is egyszerre. A szintetikus szomatosztatin és GnRH analógok további előnye, hogy önmagukban is daganatellenes hatással bírnak [79]. PhD kutatómunkám során GnRH-alapú hatóanyag-szállító rendszerek előállítását és vizsgálatát tűztem ki célul.

2.7 GnRH és receptora

A GnRH receptorainak (GnRH-R) több típusa létezik az állatvilágban. Ezek a receptorok a 7-transzmembrán, G-protein-kapcsolt receptorok (GPCR) közé tartoznak. Az emberi szervezetben egyértelműen csak a GnRH-I receptor (GnRH-I-R) jelenlétét bizonyították [80]. A GnRH-I-R legnagyobb mennyiségben az adenohipofízis gonadotróp sejtjeiben expresszálódik. A receptorfehérje jelentős mennyisége igazolt a szaporító szervek szöveteiben is, így a petefészekben, méhnyálkahártyában,

méhlepényben, emlőben és prosztatában [81-84]. A GnRH-I-R mRNS jelenlétét fiziológiás körülmények között, csekély mennyiségben, még számos egyéb szervben is kimutatták [85]. A GnRH-I-R jellegzetessége, hogy rövid, két aminosavas intracelluláris C-terminális résszel rendelkezik.

A GnRH-II receptor (GnRH-II-R) genetikai kódját emberben is azonosították, azonban ez a receptor az egészséges emberi sejtekben egy stop kodon jelenléte miatt nem expresszálódik [86-88]. Humán daganatokban azonban a GnRH-II-R, illetve egyes „splice” variánsok jelenléte és szerepe máig ellentmondásos [89-92].

A gonadotropin-felszabadító hormon (gonadotropin-releasing hormon, röviden: GnRH) a neuropeptidek családjába tartozó decapeptid, melynek számos változata alakult ki az evolúció során. Közös jellemzőjük, hogy 10 aminosavból állnak, és jellegzetes szekvencia azonosságot mutatnak [80]. Az emberi szervezetben kizárólag a GnRH-I és -II izoformák termelődnek [93].

Az emlősökben előforduló GnRH-I aminosav sorrendje Gln-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly-NH₂, ahol a Gln piroglutaminsavat jelent [94]. A GnRH-I a hipotalamuszban termelődik és tropikus hormonként, pulzatív felszabadulásával szabályozza a follikulus stimuláló hormon (FSH) és a luteinizáló hormon (LH) termelését és kiválasztását az agyalapi mirigy elülső lebenyében, az adenohipofízisben. Ezáltal közvetett módon szabályozza a gonádok működését, az ivarsejtek és a nemi hormonok termelését [95]. GnRH-I jelenléte a központi idegrendszeren kívül kisebb mennyiségben különféle perifériás szövetekben is igazolt, ahol szintén fontos élettani szerepe van [96, 81, 97, 84].

A GnRH-II szerkezete Gln-His-Trp-Ser-His-Gly-Trp-Tyr-Pro-Gly-NH₂, amely evolúciósan konzerválódott, közel 500 millió éve változatlan formában van jelen az élővilágban [80]. A GnRH-II expresszióját emberi agyban és extrahipofizeális szövetekben egyaránt igazolták, perifériás megoszlása a GnRH-I-hez képest nagyobb, különösképp a vesében, a csontvelőben és a prosztatában [96, 98, 97, 90, 93, 99, 100]. Állatok esetében elsősorban a fajfenntartáshoz kapcsolódó magatartás szabályozásáért felel, de ezen kívül számos egyéb fontos élettani funkciót is tulajdonítanak neki (neuromodulátor, idegrendszer fejlődése, energiamérleg szabályozása) [101, 90, 102, 95]. A GnRH-II szerepe az emberi szervezet perifériás szöveteiben még nem pontosan tisztázott, de fontos szerepet játszik a fajfenntartásban. Hatását emberi szervezet egészséges sejtjeiben feltehetően a GnRH-I receptoron keresztül fejt ki [86, 103, 90, 99, 95]. Azonban meglepő módon petefészek és méhnyálkahártya-rák sejtvonalak esetében a

GnRH-II analógok GnRH-I receptortól független daganatellenes hatását is bizonyították [89, 104].

A GnRH analógok szerkezetére jellemző, hogy az N-terminális (Glp¹-His²-Trp³-Ser⁴) és C-terminális (Pro⁹-Gly¹⁰-NH₂) aminosav-sorrend egy-két kivételtől eltekintve nem változott az evolúciós fejlődés során. Ezeknek az aminosavaknak nélkülözhetetlen szerepük van a GnRH receptorokhoz történő kötődésben. A centrális, 5-8. helyen lévő aminosavak jelentősen befolyásolják a peptidek konformációját és receptor-affinitását. Az itt található különféle aminosavak az egyes analógok hatásbeli és aktivitásbeli különbségeiért felelősek [80]. Például a GnRH-I nagyobb affinitással képes kötődni a GnRH-I receptorhoz, mint a GnRH-II, ez utóbbi pedig a GnRH-II receptorral szemben mutat nagyobb affinitást. Jelenlegi ismereteink szerint azonban az emberi szervezetben fiziológiás körülmények között a GnRH-II-nek is a GnRH-I receptor közvetíti a hatását, de az a GnRH-I-től eltérő jelátviteli utakat aktivál [105, 90, 80]. Tovább nehezíti a GnRH receptorok és ligandjainak eltérő viselkedésének megértését, hogy a GnRH receptorok mikrokörnyezettől függő módon, eltérő konformációkat vesznek fel, eltérő jelátviteli utakat aktiválhatnak [91, 106]. A GnRH receptorok és ligandjaik ebből fakadó összetettségét „*ligand induced selective signaling*” vagyis ligand indukált szelektív jelátvitelként említik a szakirodalomban [87, 107].

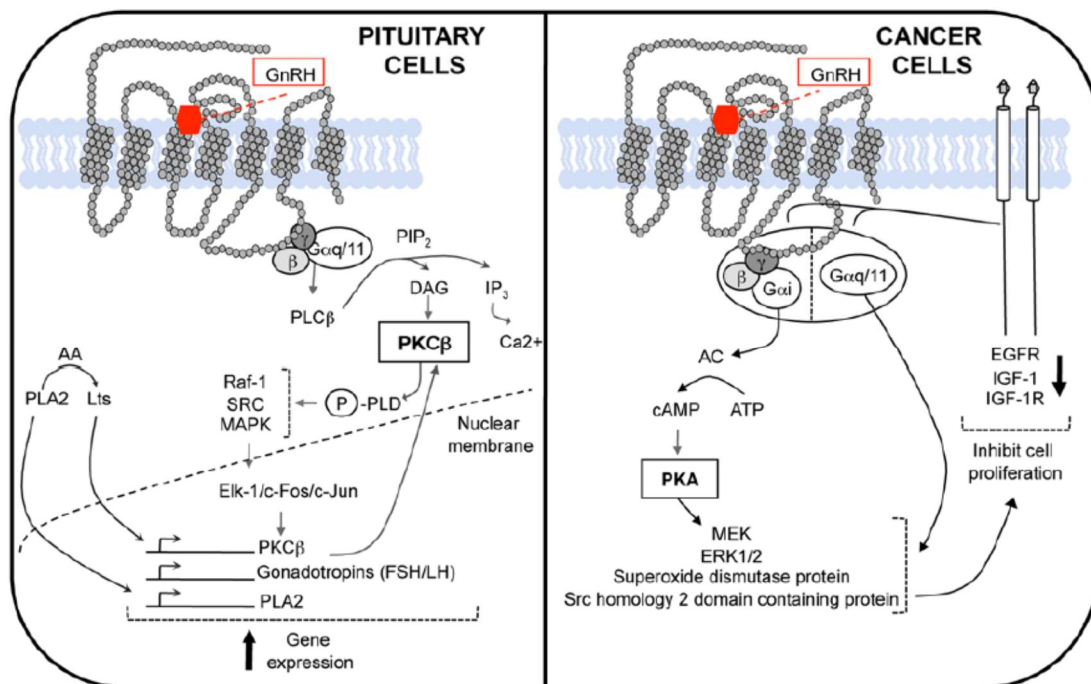
A GnRH analógok által kiváltott sejtválasz változatosságának egy másik lehetséges okát a GnRH-R szövet-specifikusan expresszálandó, különböző aminosav szekvenciát tartalmazó fehérje darabjai, úgynevezett „splice” variánsai képezik [108]. Az így keletkező csonka receptorok bár nem képesek a teljes receptorok általi jelátvitel indukálására, azok működését mégis befolyásolhatják [109].

2.8 GnRH analógok jelentősége a daganatterápiában

Számos tanulmány igazolta, hogy a GnRH-I-R nagy mennyiségben expresszálandó számos rosszindulatú daganatban is, függetlenül attól, hogy azok a szaporító szervrendszerhez tartoznak-e vagy sem. Így a receptor jelenlétét kimutatták prosztatata [110, 111], mell [112, 113], petefészek [114] és méhrákon [115] kívül melanómákban [116], glioblasztómában [117], limfómában [118], leukémiában [96], máj- [119], gége- [120], vastagbél- [121], vese- [122], tüdő- [123] és hasnyálmirigyrákokban [124]. Megfigyelték továbbá, hogy GnRH-I-R mRNS mennyisége prosztatata [125] és petefészekrákok [126] esetén betegség progressziójával pozitívan korrelál, és a GnRH analógok hatással vannak a ráksejtek inváziójára és áttétképzési hajlamára is [127, 128].

A GnRH-R expresszáló tumorokban a GnRH jelenléte aktív, autokrin/parakrin GnRH/GnRH-R szabályozó funkciót feltételez [129]. Bizonyítást nyert, hogy az EGF indukálni képes a natív GnRH-II expresszióját, ami fokozza a petefészekrák sejtek inváziós hajlamát [130]. Ezzel párhuzamosan GnRH agonista, illetve antagonistá analógokkal történő kezelések során antiproliferatív [131] és apoptózist indukáló hatásokról [132], továbbá áttétképződést [133, 134] és angiogenezist gátló hatásokról [135] is beszámoltak.

Az agyalapi mirigy gonadotróp sejtjeivel ellentétben, az agonista és antagonistá GnRH analógok hatásmechanizmusában tapasztalható különbség nem jelentkezik daganatsejteken. Daganatsejtek esetén, az antagonistá GnRH analógok is agonistaként viselkednek. [129, 136]. Ennek oka, hogy a gonadotróp sejtekben és az extrahipofízeális szövetekben végbemenő GnRH-R jelátviteli útvonalak különböznek egymástól (6. ábra) [137].



6. ábra: A GnRH-I-R által aktivált jelátviteli utak hipofízeális és tumoros sejtekben.

Az adenohipofízis gonadotróp sejtjeinek GnRH-I receptorai ligand kötés hatására Gαq/11 fehérje közvetítette foszfolipáz-C (PLC) aktivációt váltanak ki, mely közvetve a citoplazma Ca^{2+} szintjét is szabályozza. A jelátvitelében érintett további fehérjék a proteinkináz C (PKC), illetve a mitogén-aktivált proteinkinázok (MAPK), melyek összességében a gonadotróp hormonok bioszintézisét és felszabadulását szabályozzák [138]. A Gαq/11 fehérje mellett a Gαs közvetített cAMP útvonal is fontos szerepet játszik a gonadotróp sejtek jelátvitelében [139].

Az extrahipofizeális szövetekben és daganatokban tanulmányozott GnRH-I-R a G α i fehérjén keresztül az intracelluláris cAMP csökkenését eredményezi, és számos jelátviteli utat aktivál. Ezekben a jelátviteli utakban érintett fehérjék a p38 MAPK, ERK1/2, JNK, PI3K/Akt és foszotirozin-foszfataz [139, 140]. A GnRH indukált jelátvitel több növekedési faktor receptor működését is képes befolyásolni [136], gátló hatást tud kifejteni például az EGF és IGF-1 receptorok jelátvitelére [141, 142].

A gonadotróp- és a daganatsejteken található GnRH-I-R kötődési affinitásában is tapasztalható eltérés. Az agyalapi mirigy nagy affinitású receptoraival szemben, tumorokban nagy affinitású és kis kapacitású, valamint kis affinitású és nagy kapacitású receptorokat egyaránt azonosítottak [143, 144, 115]. A későbbi kutatások során bizonyítást nyert, hogy a gonadotróp és a perifériás sejtek egyaránt a GnRH-I-R ugyanazon cDNS-ét, mRNS-ét, és fehérjéjét tartalmazzák [114, 111, 139].

2.8.1 Hormonfüggő daganatok terápiája

A hipotalamusz-hipofízis-gonád tengely működésének megértése a GnRH szintetikus analógjainak két alapvető klinikai alkalmazását tette lehetővé:

1. A GnRH hiány okozta betegségek kezelése, így például a nemzőképesség fenntartása [145].
2. Az GnRH receptor gátlásán keresztül a gonadotróp hormonok kiválasztásának, ezáltal a gonádok működésének és a nemi hormonok szintjének csökkentése. Ezt a felhasználási módot gyógyszeres, vagy kémiai kasztrációként is említik a szakirodalomban [146].

A második felhasználási mód háttérében az áll, hogy a GnRH analógok folyamatos és nagy mennyiségben történő adagolása a hipofizeális GnRH receptorok „deszenzitizációját”, internalizációját és a receptorok számának csökkenését eredményezi. Ezáltal megszűnik a gonadotróp hormonok elválasztása, mely végül a nemi hormonok termelésének leállítását eredményezi. A nemi hormonok számos daganat számára kulcsfontosságú növekedést serkentő faktorok, ezeket hormonfüggő daganatoknak nevezzük. Hormonfüggő prosztatata-, illetve emlődaganatok kezelésére szintetikus GnRH analógokat jelenleg széles körben alkalmaznak a klinikumban [91]. A GnRH analógok további terápiás felhasználása az endometriózis és a jóindulatú prosztatata megnagyobbodás kezelése [147].

Mivel a natív GnRH-I féléletideje rövid (2-5 perc), ezért az agonista hatású analógokban a hatos helyzetű L-glicint általában D-aminosavak helyettesítik, jelentősen

növelve a stabilitást [148]. A tizes helyzetű glicin pedig egyes analógok esetében a receptor affinitás fokozása érdekében módosított. Az agonista analógok hátránya, hogy a GnRH receptorok „*down-regulációja*” hosszabb időt vesz igénybe (14-28 nap). Az alkalmazásuk megkezdését követő átmeneti időszakban, még a terápiás hatás kialakulása előtt, a gonadotróp hormonok emelkedett szintje figyelhető meg, ezt a nemkívánatos hatást „*flare-jelenség*”-nek nevezik. A klinikumban alkalmazott GnRH agonista vegyületek a leuprolide, goserelin, nafarelin, triptorelin és buserelin [91], melyek elsősorban szubkután adagolt, lassú felszívódású készítmények [149, 150].

A flare-jelenség elkerülése érdekében több antagonistá hatású analógot is kifejlesztettek a későbbiekben. Ezek a vegyületek kompetitív módon kötődnek a GnRH receptorhoz, gyors és hosszan fenntartott gátló hatást fejtve ki. Szerkezetükre jellemző, hogy több nem természetes, többnyire D-konfigurációjú és apoláris aminosavat tartalmaznak. Ebből kifolyólag az antagonistá vegyületek klinikai alkalmazását leginkább a rossz oldhatóság és az anafilaxiás reakciók nehezítik. A jelenleg forgalmazott antagonistá analógok: cetorelix, ganirelix, abarelix és degarelix [91].

2.8.2 GnRH analógok direkt daganatellenes hatása

A szintetikus GnRH analógok legkorábban felismert tumorelles hatásmechanizmusa, hogy képesek a gonadotróp hormonok termelését leállítani [151]. A későbbi kutatások igazolták, hogy a GnRH-R az agyalapi mirigyen kívül a szaporító szervek egyes szöveteiben, illetve számos daganatos szövetben is előfordulhat [152].

Bizonyítást nyert, hogy perifériás szövetekben a GnRH autokrin/parakrin szabályozó funkciót tölt be, fiziológias és patológias állapotban egyaránt [91]. Ezt a tényt támasztja alá, hogy hormon rezisztens prosztata- [110], illetve emlődaganatok [153] is érzékenyen reagálnak GnRH analógokkal történő kezelésekre. Daganatellenes hatásról számoltak be szaporító szervrendszertől független, egyéb GnRH-R expresszálo tumorok esetében is, például melanóma [116] és glioblasztóma [154] sejteken. Ezek az eredmények igazolták, hogy a szintetikus GnRH analógok agyalapi mirigy független, közvetlen daganatellenes hatással is rendelkeznek.

A GnRH analógok antiproliferatív, áttétképződést gátló és apoptózist indukáló hatása azonban nem minden GnRH analóg, illetve daganattípus esetében egyértelmű. A GnRH receptorok mikroköznyezethez alkalmazkodó, bonyolult jelátvittele miatt a különböző GnRH analógok hatásmechanizmusának kutatását számos ellentmondó eredmény és nyitott kérdés jellemzi [91, 155].

2.8.3 GnRH, mint irányító molekula

A szintetikus GnRH analógok korszerű és ígéretes felhasználása hatóanyag-szállítóként történő alkalmazásuk a célzott daganatterápiában. Terápiás jelentőségük hátterében az a felismerés áll, hogy a számos daganatban kimutatták a GnRH-R jelenlétét. Prostatata tumorok esetén igazolták, hogy a GnRH-R nagyobb mennyiségben expresszálódik, mint fiziológiás állapotban [85]. Hormon-rezisztens prostatata tumorokban a GnRH-R még fokozottabb expresszióját tapasztalták a hormon-szenzitívekhez képest [125]. Hasonlóképp, petefészekrákok esetében a GnRH-I-R fokozott expressziója, a betegség súlyossága és a rosszabb túlélés között találtak összefüggést, prognosztikus jelentőséget tulajdonítva a GnRH-I-R expressziójának [156].

A GnRH-I-R a ligandum-kötés után internalizálódik, majd a ligandum a receptor-közvetített endocitózis során a receptorról disszociál. A receptorok egy jelentős hányada szekrécios vezikulák segítségével visszajut a membránba, a ligandumok pedig az endoszómákból kialakuló lizoszómákban lebontó enzimek hatására degradálódnak [157-159]. A GnRH-I-R egyedi szerkezeti tulajdonsága, hogy C-terminális citoplazmatikus fark rész hiányzik. Ennek betudható, hogy a G-fehérje kapcsolt receptoroktól eltérő módon a GnRH-I receptorra lassú internalizáció és deszenzitizáció a jellemző [160]. Arra vonatkozóan is vannak adatok, hogy prostatata tumorok esetében a GnRH-R expressziója hosszas GnRH terápia mellett is fenntartott [161]. További előnye a GnRH-nak, hogy önmagában is tumor növekedést gátló hatással bír, ezáltal is fokozva a terápiás hatást. Összességében ezeknek a tulajdonságoknak köszönhető, hogy a szintetikus GnRH analógok hatékonyan felhasználhatók különféle hatóanyagok célzott bejuttatására a daganatsejtekbe. Ez a felismerés diagnosztikai és terápiás szempontból is kiemelt jelentőséggel bír [79].

A GnRH analógok hatóanyag-hordozóként történő alkalmazása érdekében, eleinte a natív GnRH-I aminosav szekvenciáját módosították. A hatos helyzetű glicin D-lizinre történő cseréje eredményezte az egyik legsikeresebb és leggyakrabban alkalmazott peptidet, a D-Lys⁶-GnRH-I analógot (zoptarelin) [162]. A D-lizin beépítése következtében a peptid stabilitása, ezáltal féléletideje jelentősen megnőtt. A D-lizin oldalláncán található ε-aminocsoport pedig megfelelő funkciós csoport hatóanyagok kémiai kapcsolására, a receptor kötődés megtartása mellett. Hasonlóképp, a GnRH-II hatóanyag-célbajuttatásra tervezett analógja a D-Lys⁶-GnRH-II. A D-Lys⁶-GnRH-I és D-Lys⁶-GnRH-II daunorubicint tartalmazó konjugátumaival végzett összehasonlító kísérletek igazolták,

hogy mind a két hatóanyag-szállító rendszer hatékony emlő- (MCF-7) és vastagbélrák (HT-29) sejteken [163].

A későbbi kutatások során került reflektorfénybe egy újabb analóg, a GnRH-III (Glp-His-Trp-Ser-His-Asp-Trp-Lys-Pro-Gly-NH₂), melyet tengeri ingolából (*Petromyzon marinus*) izoláltak először [164]. Hatóanyag-szállítóként történő alkalmazását a daganatterápiában számos előnyös tulajdonsága indokolja [165]. Az egyik leglényegesebb jellemzője, hogy a GnRH-I és -II analógokhoz képest emlősökben nagyságrendekkel kisebb endokrin hatással rendelkezik [166]. A GnRH-III a gonadotrop sejtek GnRH receptorain csak gyenge agonistaként viselkedik, azonban ráksejtek felszínén található nagy és kis affinitású receptorhoz egyaránt képes kötődni, melyeken daganatellenes hatást fejt ki [167]. A GnRH-III természetes aminosav szekvenciája nyolcas helyzetben tartalmaz hatóanyag kapcsolására alkalmas lizint. A lizin szabad ε-aminocsoportjának hiánya esetén még kisebb endokrin hatás tapasztalható [168], ami különösen a hormon-független daganatok terápiája esetén előnyös.

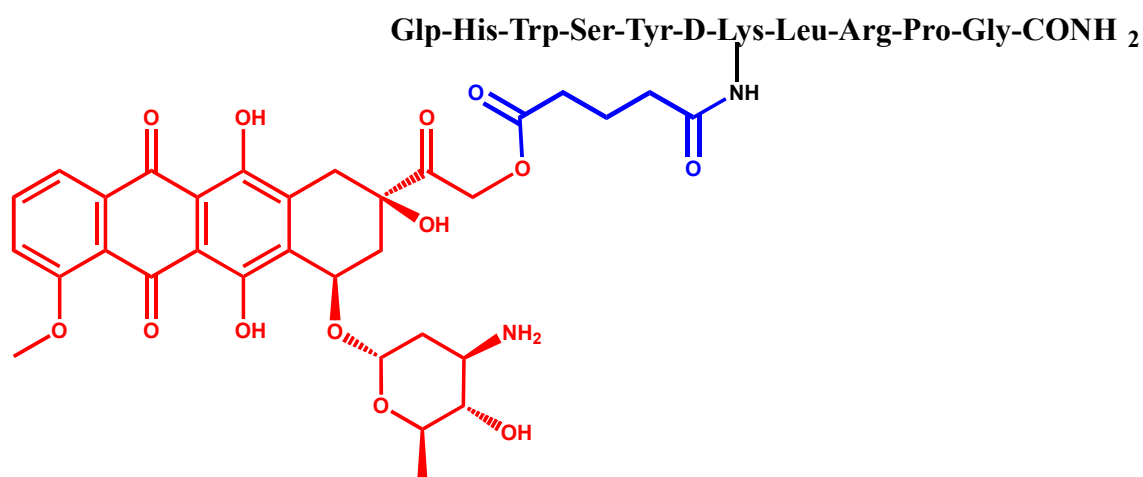
A hatóanyagokkal kapcsolt GnRH analógok, azaz a GnRH konjugátumok fontos szerkezeti jellemzője a hatóanyag és a peptid közötti távolság, illetve az őket összetartó kémiai kötések stabilitása. Annak érdekében, hogy a hatóanyag az irányító peptid receptor kötődését ne gátolja, bizonyos esetekben összekötő egységet (más néven spacer, vagy linkert) kell alkalmazni. Az összekötő egységnek a kedvezőtlen szterikus kölcsönhatások elkerülése mellett kulcsfontosságú szerepe van abban, hogy stabilitásával a konjugátum hatóanyag-leadó képességét és szelektivitását befolyásolja.

2.8.4 Daganatellenes GnRH konjugátumok

Terápiás célra főként a GnRH citotoxikus anyagokkal kapcsolt konjugátumait állították elő a közelmúltban. Számos vegyülettel próbálkoztak, ilyenek többek közt a ciszplatin, melfalán, metotrexát, kamptotecin és antraciklin származékok [79]. A citotoxikus anyagok közül a legígéretesebb eredményeket eleinte a doxorubicin, illetve ennek nagyságrendekkel hatásosabb származéka, a 2-pirrolino-doxorubicin konjugátumai mutatták [162].

A Schally és kutatócsoportja által kifejlesztett D-Lys⁶-GnRH-I konjugált doxorubicin (AN-152, később AEZS-108, illetve Zoptarelin-doxorubicin) és a 2-pirrolino-doxorubicin származék (AN-207) emlő, prosztata petefészek és méhnyakrák esetén szignifikáns daganatellenes hatást mutat *in vivo* [169]. További kísérletek igazolták, hogy a vastagbél- [121] és hasnyálmirigyrák [170] is potenciális célpontok lehetnek. A

Zoptarelin-doxorubicin és AN-207 esetében a hatóanyagot észterkötéssel egy glutársav összekötő egységen keresztül kapcsolták a D-Lys⁶-GnRH-I lizinjéhez (7. ábra).



7. ábra: A Zoptarelin-doxorubicin szerkezete. A D-Lys⁶-GnRH-I fekete, a glutársav összekötő egység kék, a doxorubicin piros színnel van jelölve.

Az észterkötésre jellemző, hogy könnyen hidrolizálhat, az emberi szervezetben általánosan jelenlévő karboxilészteráz enzimek bontani képesek, tehát fiziológiásan kevésbé stabil [171]. Ennek eredménye, hogy a konjugált hatóanyag már a célba jutás előtt felszabadulhat, ezáltal egészséges szöveteken is kifejtve toxikus hatását [79, 172]. Ez számos kérdést vetett fel és bizonytalanságra adott okot, ennek ellenére az észterkötést tartalmazó Zoptarelin doxorubicin méhrákok kezelésére klinika III; petefészek, prosztata, mell és húgyúti rákok esetén klinika II fázisba jutott (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT01767155). Ezek az eredmények komoly motivációt adtak további daganatellenes GnRH konjugátumok kifejlesztésére.

G. Mező és kutatócsoportja számos, doxorubicint és daunorubicint tartalmazó GnRH-III konjugátumot állított elő. A GnRH hármasként az alkalmazását alapvetően kisebb endokrin hatása indokolja. Konjugátumaikban észter-, hidrazon-, oxim- vagy karbamát kötést tartalmazó összekötő egységet is alkalmaztak, melyek eredményességét emlőrák (MCF-7) és vastagbélrák (HT-29) sejtvonalon hasonlították össze [173]. Tapasztalataik alapján az észter- és a hidrazon-kötést tartalmazó konjugátumok hatásosak, de bomlékonyságuk miatt toxikusabbak is. A karbamát kötést egy p-aminobenziloxikarbonil (PABC) rész beépítésével alakították ki, melyhez további két aminosav (Phe-Lys) is kapcsolódik. Ez a rendszer egy jellegzetes enzim labilis összekötő egységet képez (self immolative spacer), mely kedvező hatóanyag-leadási tulajdonságokkal rendelkezik. Az oxim-kötést tartalmazó konjugátumok esetén, az oxim-

kötés nagy stabilitása miatt a hatóanyag nem szabadul fel, ezért a GnRH-III peptidhez kötött módon fejt ki hatását [172]. Ezért az oxim-kötés esetén a terápiás hatás közel két nagyságrenddel magasabb koncentrációban jelentkezik a szabad hatóanyaghoz képest [173], azonban még a magasabb dózis mellett is kedvezőbbek a hatóanyag okozta mellékhatások *in vivo* [174, 175].

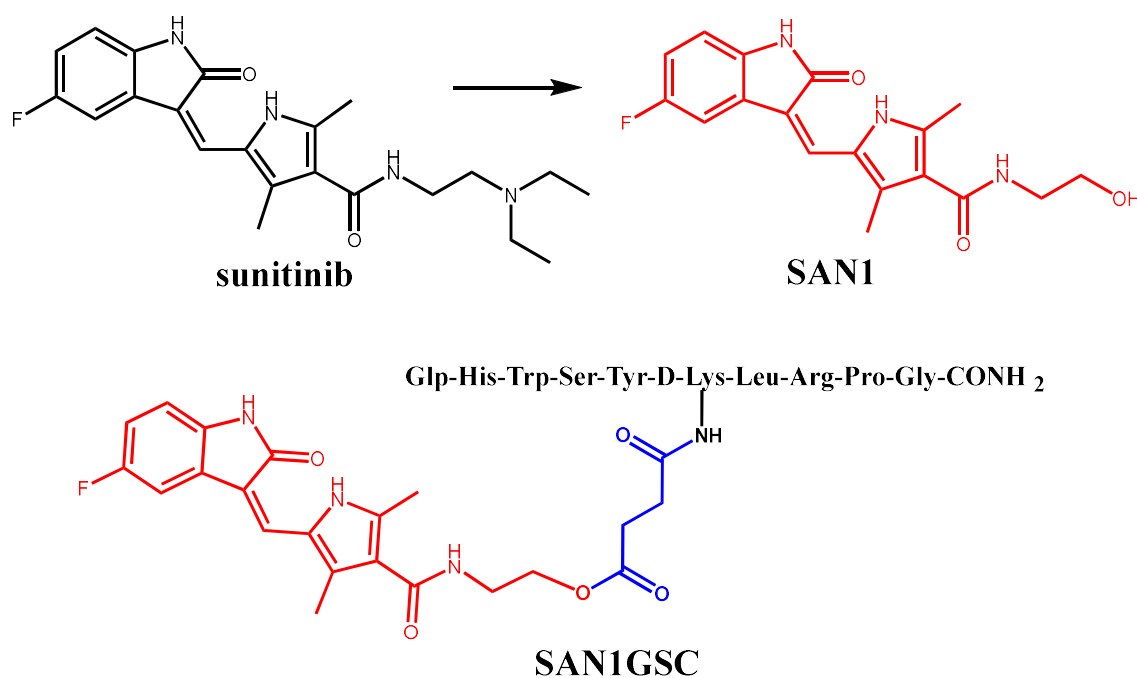
T. Karampelas és munkatársai gemcitabint tartalmazó D-Lys⁶-GnRH-I konjugátumokat állítottak elő, melyekben a hatóanyagot észterkötéssel kapcsolták. Három fő céljuk volt a gemcitabin konjugálásával: csökkenteni a gemcitabin metabolizmusát, célzott bejuttatást elérni a ráksejtekbe és a gemcitabin-indukált rezisztenciát (nukleozid transzporter hiány) csökkenteni. Konjugátumaik között a konjugálás helye (3'-OH vagy 5'-OH), ezáltal aromás, vagy alifás észterkötés kialakítása, illetve az összekötő rész hossza (glutársav vagy borostyánkősav) volt a különbség. Hormon rezisztens prosztata tumor sejteken (DU145 és PC3) *in vitro* és *in vivo* igazolták, hogy a legjobb konjugátum hatásosabb és több szempontból előnyösebb, mint a szabad gemcitabin [176].

Fotodinámiai kísérletekben bizonyították, hogy a GnRH analógokkal konjugált fototoxikus protoporfirin IX is szelektíven bejuttatható a GnRH-R expresszáló sejtekbe, ezáltal a fénykezelés után jelentkező sejtkárosító hatás a célsejtekre korlátozható [177].

A GnRH nem citotoxikus hatásmechanizmusú vegyületek esetében is bizonyította hatóanyag-szállítóként történő alkalmazásának előnyeit. A kurkuminnal konjugált D-Lys⁶-GnRH-I apoptózis indukáló, tumorelles hatását mutatták ki GnRH-R expresszáló hasnyálmirigyrák sejteken *in vitro* és *in vivo* [178]. A kurkumint glutársav összekötő egységen keresztül, észterkötéssel kapcsolták a peptidhez. A szabad kurkumin hasnyálmirigyrák sejteken nem mutatott tumorelles hatást, melyben rossz vízoldhatósága jelentős szerepet játszik. Azonban a konjugált kurkumin jobban oldódik, lehetőséget teremtve az intravénás adagolásra. Ígéretes terápiás lehetőségnek bizonyul a GnRH célzott gén hordozó rendszerként történő alkalmazása is, melyek fejlesztésére már történtek kísérletek [179].

O. Agyros és munkatársai 2016-ban, elsőként publikáltak kinázgátló-GnRH konjugátum szintéziséről és tumorelles hatásáról [180]. Stratégiájuk számos analógiát mutat a PhD kutatómunkámban kitűzött célokkal és megvalósított koncepcióval. Különbség a kiválasztott hatóanyag között van, ők sunitinibet én crizotinibet konjugáltam. A sunitinib több célpontú, kismolekulás kinázgátló, jelenleg bizonyos vese- és emésztőrendszeri daganatok esetében engedélyezett. Daganatellenes hatását elsősorban

az érképződés gátlása révén fejt ki [181]. Mivel több célpontú inhibitor, alkalmazása számos mellékhatással jár, bizonyítottan kardiotoxikus vegyület [182]. A mellékhatások klinikai alkalmazását is korlátozzák, részben ennek tudható be, hogy prosztata- [183] és mellrákok [184] esetében az engedélyezése klinikai III fázisban megakadt. Másfelől a prosztata- és emlődaganatok többsége a szakirodalomból ismert módon fokozott GnRH-R expressziót mutat (lásd fentebb). Ezen okoknál fogva a sunitinib GnRH-val történő konjugálását O. Agyros és munkatársai ígéretes megoldásnak tartották [180]. A konjugátumok előállítása érdekében a sunitinib szerkezetét módosítani kellett, mert eredeti formájában nem tartalmaz kémiai kapcsolásra alkalmas funkciós csoportot. Ezért több előállított analóg közül kiválasztották a leghatásosabb vegyületet (SAN1), melyet észterkötés kialakításával, borostyánkősav összekötő egységen keresztül kapcsoltak a D-Lys⁶-GnRH-I peptidhez (8. ábra).



8. ábra: A sunitinib, SAN1 és SAN1GSC konjugátum szerkezete. A borostyánkősav összekötő egység kék, a SAN1 piros színnel van jelölve.

Prosztatarák sejteken (DU145) a SAN1GSC konjugátum *in vitro* és *in vivo* hatékonyabbnak bizonyult mind a sunitinibhez, mind a SAN1 analóghoz képest. A konjugált SAN1 négyszer magasabb koncentrációt ért el a tumorban, mint szabad formájában. A kardiotoxicitás és hematotoxicitás csökkenése is mérhető volt. Nem várt eredmény az RPS6KB1 (riboszómális protein S6 kináz B1) gátlása, ami szoros összefüggésben áll a prosztata tumor agresszivitásával és áttétképzési hajlamával [185].

Az RPS6KB1-gátlás kizárólag a konjugátum esetén volt megfigyelhető, ennek pontos okát azonban nem sikerült feltárni [180]. Ez az eredmény azonban felhívja a figyelmet arra, hogy egyes jelátvitelt gátló szerek hatása és a GnRH-R stimulált jelátvitel szinergista daganatellenes hatást fejthet ki.

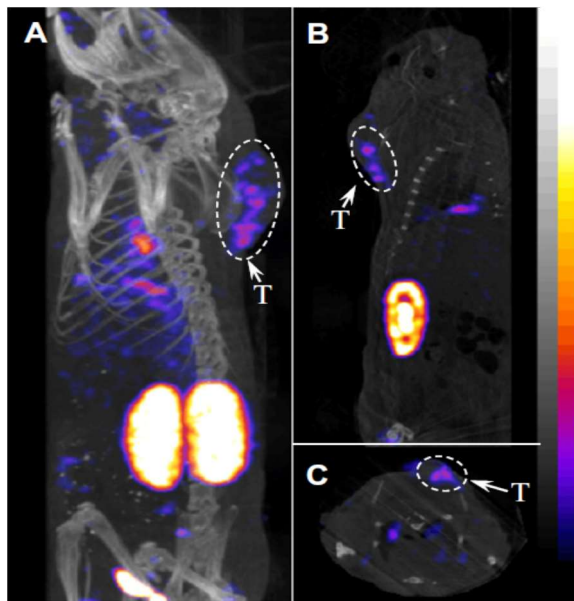
2.8.5 Diagnosztikai célú GnRH konjugátumok és a GnRH-R-célzott terápia korlátai

Diagnosztikai célra számos izotópjelölt GnRH analógot állítottak elő a közelmúltban. Az izotópjelölés előnye a nagyon alacsony kimutatási határ, ezért a daganatok képalkotása mellett [186-189], receptor affinitás vizsgálatára is alkalmazhatók [190].

Schottelius és munkatársai ^{68}Ga és ^{18}F jelölt D-Lys⁶-GnRH-I analógokat állítottak elő [191]. Tapasztalataik szerint a konjugátumok receptor affinitása szempontjából meghatározó az alkalmazott spacer hossza, és előnyösebb a hidrofób karakterű vegyületek kapcsolása a GnRH hordozóhoz. A referenciaként számon tartott [^{125}I]Triptorelinnel 1 órán keresztül kezeltek több daganat-sejtvonalat (EFO-27, LNCaP, MDA-MB-231, SKBR-3). Két sejtvonal esetén (DU-145, SKOV-3) a [^{125}I]D-Lys⁶-GnRH-II-t alkalmazták. Az eredmények mindegyik sejtvonal esetében csekély sejtfelszíni GnRH-R expressziót igazoltak. Ezzel összefüggésben az OVCAR-3 petefészekrák xenograftot tartalmazó *in vivo* egérmodellben sem tapasztaltak dúsulást a tumorban. A [^{125}I]Triptorelin 60 perccel az intravénás beadás után legnagyobb mennyiségben az emésztőrendszerben és a vesékben volt kimutatható, melyek a kiürülésben leginkább érintett szervek. A GnRH-I-R lassú internalizációja és a relatíve alacsony sejtfelszíni expressziója miatt megkérdőjelezték, hogy a GnRH-I-R megfelelő molekuláris célpont lehet-e a daganatok izotópjelölt GnRH analógokkal történő megjelenítésére [191]. Érdekes módon ez az eredmény ellentmondásban áll a citotoxikus GnRH konjugátumok esetében tapasztalt szignifikáns daganatellenes hatással. Fontos különbség azonban, hogy citotoxikus konjugátumok hosszantartó kezelésével ellentétben, a radiojelzett analógok esetében csak egyszeri, és rövid ideig tartó kezelés történt, majd 1 óra elteltével történt a detektálás.

Proszzata (DU-145) [186] és emlőrák (MDA-MB-231) [187] xenograftot tartalmazó egerek estében H. Guo és munkatársai ^{111}In jelölt GnRH analógjaikkal az intravénás beadást követően, időfüggő módon, már mérhető dúsulást mutattak ki a tumorban a vérhez és egyéb szövetekhez képest, ami sikeresebb képalkotást eredményezett. Azonban

a 9. ábrán látható, hogy a vesében és a májban továbbra is magasabb sugárzást mértek a tumorhoz képest [186].



9. ábra: Háromdimenziós SPECT/CT felvétel DU-145 prosztata tumor xenogaftot tartalmazó egérről, 1 órával a ^{111}In -DOTA-Ahx-D-Lys⁶-GnRH-I intravénás beadását követően. (T: tumor)

A. Finch és munkatársai MCF-7 mellrák sejteken bizonyították, hogy a GnRH-R csak igen kis hányada (<1%) helyeződik ki a sejtmembránba, a receptorok többnyire az endoplazmás retikulumban maradnak. Membrán permeábilis chaperon (IN3) segítségével azonban a sejtfelszíni GnRH-R mennyiségének növekedését érték el, a fehérje expresszió befolyásolása nélkül [192]. Ennek oka, hogy az IN3 a GnRH-R transzlokációját és membránba történő kihelyeződését indukálja, ami terápiás jelentősége mellett a kompartmentalizáció fontos szerepére is felhívja a figyelmet. Az IN3 GnRH-R transzlokáció-indukáló hatását primer prosztatarák sejt kultúrák esetében [193], majd HeLa méhnyakrák és LβT2 gonadotrop sejteken is bizonyították, ráadásul a GnRH-antagonista cetorelixszel történő 18 órás kezelés után is a GnRH-R sejtfelszíni mennyiségének a növekedését tapasztalták [194].

Ez utóbbi eredmény magyarázatot adhat arra, hogy a relatíve hosszantartó kezelést követően, miért bizonyulhatnak eredményesnek a daganatellenes GnRH konjugátumok, ellentétben az izotópjelölt analógokkal, melyek nem sokkal a beadásukat követően a GnRH receptorok csekély sejtfelszíni expresszióját igazolták. Ezt a feltételezést megerősíti, hogy a GnRH-agonista leuprolide LNCaP és PC-3 prosztatarák sejtekben szintén indukálja a GnRH-R kihelyeződését a sejtmembránba [195]. További tumortípusok esetén, a különféle GnRH analógok GnRH-R expressziót és membrán transzlokációt indukáló hatásáról azonban nincsenek egyértelmű adatok [196]. Nem mindig egyértelmű az sem, hogy a sejtfelszíni receptorok száma elegendő-e a szükséges

menyiségű hatóanyag célzott bejuttatáshoz. Erre többnyire csak a már publikált, daganatellenes konjugátumokkal történő kezelések eredményeiből, indirekt módon következtethetünk. Ezek az eredmények azonban az eltérő vizsgálati módszerek miatt, a legtöbb esetben nehezen összevethetők.

További kérdéseket vet fel, hogy a GnRH-R jelenlétét, vagy fokozott expresszióját a legtöbb daganatsejt-típus esetében csak mRNS, illetve a teljes GnRH-R fehérje szintjén igazolták [191]. Azonban a terápiás szempontból meghatározó, sejt-membránban lévő GnRH-R jelenlétét már sokkal ritkábban vizsgálták. A sejtfelszíni GnRH-R mennyiségét vizsgáló kísérletek elsősorban izotópjelölt GnRH analógokkal történtek, esetleg immuncitokémiai módszerrel, amennyiben a sejteket az antitest-jelölés előtt nem permeabilizálták. A sejtfelszíni GnRH-R fokozott expresszióját nagy esetszámban, meggyőző módon ezidáig csak prosztatá-, mell-, méh- és petefészekrákok esetén igazolták, melyeket egy 2005-ös tanulmány foglal össze [169]. A daganatellenes GnRH konjugátumokkal is többnyire csak ezen daganattípusok esetén értek el komolyabb klinikai eredményeket. A GnRH analógokat és receptoraikat övező számos nyitott kérdés mellett, további bizonytalanságra adhat okot a GnRH-R-célzott hatóanyag-szállító rendszerek hatékonyságát illetően, hogy a biztató eredmények ellenére, még egyetlen daganatellenes GnRH konjugátum sem került forgalomba. PhD kutatómunkám során ennek lehetséges okait is megpróbáltam körüljárni.

A szakirodalom áttanulmányozása után megállapítottam, hogy fluoreszcens vegyülettel konjugált GnRH analógokról szinte egyáltalán nem található adat. Ezt a hiányt részben kompenzálja, hogy a doxorubicint, illetve daunorubicint tartalmazó GnRH konjugátumok fluoreszcensen gerjeszthetők. Azonban ezeknek a konjugátumoknak a sejtekben történő fluoreszcens detektálása ritkán alkalmazott vizsgálati módszer, amit erős sejttoxicitásuk is korlátozhat [197, 198]. Ennek következtében a különféle tumorsejtekbe a GnRH receptoron keresztül bejuttatható hatóanyagok mennyiségére fókuszáló kísérletek és összehasonlító irodalmi adatok is nagyon ritkák. Mivel a GnRH analógok is képesek a GnRH-R membrán-transzlokációját indukálni, ezért meglátásom szerint a GnRH-R-célzott terápia megbízható predikciójára a fluoreszcensen jelölt GnRH analógokkal kezelt sejtek vizsgálata lehet egy racionális megoldás *in vitro*. A fluoreszcensen jelölt GnRH analógok eredményei kulcsfontosságú információkat adhatnak a további daganatellenes célú GnRH konjugátumok sikeres fejlesztéséhez, hatásmechanizmusuk pontos megértéséhez.

3. Célkitűzések

PhD kutatómunkám során a GnRH-R-célzott daganatterápia alkalmazásának lehetőségeit tanulmányoztam. A GnRH-R expresszálo daganatsejtekbe bejuttatható fluoreszcensen jelölt GnRH analógok vizsgálata elsősorban a célzott terápiás hatékonyság predikciójára irányult *in vitro* daganatmodelleken.

Kutatómunkám során kitűzött célok:

1. A D-Lys⁶-GnRH-I, D-Lys⁶-GnRH-II és GnRH-III analógok jelölése fluoreszcein-izotiocianáttal.
2. Az előállított FITC-GnRH konjugátumok fizikai-kémiai paramétereinek karakterizálása.
3. A FITC-GnRH konjugátumok lokalizációjának és mennyiségének vizsgálata *in vitro* daganatmodelleken.

A crizotinib daganatellenes hatásmechanizmusának és a GnRH-irányított hatóanyag-bejuttatás terápiás előnyének az ötvözése érdekében, további kutatómunkám során crizotinib-GnRH konjugátumok előállításával és *in vitro* vizsgálatával foglalkoztam.

Kutatómunkám során kitűzött további célok:

4. GnRH konjugátumok előállítására alkalmas crizotinib analógok előállítása.
5. Az előállított crizotinib analógok fizikai-kémiai paramétereinek karakterizálása és vizsgálata *in vitro* daganatmodellen.
6. A legígéretesebb crizotinib analógokból daganatellenes célú GnRH konjugátumok előállítása, különféle összekötő egységek és kötéstípusok alkalmazásával.
7. Az előállított crizotinib-GnRH konjugátumok fizikai-kémiai paramétereinek karakterizálása, vizsgálata *in vitro* daganatmodellen, és hatékonyságának értékelése a FITC-GnRH konjugátumok eredményeivel összevetve.

4. Anyagok és módszerek

4.1 Felhasznált anyagok

A szintézisek során, illetve a HPLC-s módszereknél alkalmazott oldószerek a Reanal Gyógyszer- és Finomvegyszergyár Zrt.-től (Budapest, Magyarország) származtak. A szintézisek során használt reagensek, aminosavak és segédanyagok a Sigma-Aldrich Kft-től (jelenleg: Merck KGaA, Darmstadt, Németország) származtak. Az egyéb helyről beszerzett anyagok és eszközök forrását az adott módszer leírásában tüntettem fel.

Az irodalomkutatáshoz a Reaxys, PubMed és Scopus adatbázisokat használtam. A műszeres adatok kiértékelésére Microsoft Office 2013 szoftvercsomagot, az IC_{50} értékek és felezési idők számítására GraphPad Prism szoftvert, a kombinációs index számítására CompuSyn szoftvert alkalmaztam. Az ábrák elkészítésére CorelDRAW® X7 szoftvercsomagot és ChemDraw Prime szoftvert használtam. Az előállított vegyületeket a IUPAC nevezéktan szerint, az ACD/Name® program segítségével neveztem el.

4.2 Analitikai módszerek

4.2.1 VRK

A vékonyréteg-kromatográfiás (VRK) elválasztást egyes reakciók, illetve oszlopkromatográfiás tisztítások követésére, ellenőrzésére alkalmaztam. Állófázisnak UV fényre aktivált 200 μ m rétegvastagságú SiO_2 (25 μ m szemcseméret) lapot (Sigma-Aldrich) használtam. Eluensnek különböző oldószerek megfelelő elegyét (részletezve a vonatkozó szintézismódszereknél) alkalmaztam. A detektálás 254 nm és 366 nm hullámhosszú UV fénnel történt.

4.2.2 HPLC

A nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiát (HPLC), a szintézisek követésére, a termékek tisztítására és tisztaságának mérésére, valamint oldhatósági-, stabilitási- és permeabilitási vizsgálatok során alkalmaztam.

HPLC típusa: Jasco PU-2089 Plus; Jasco AS-2057 Plus; Jasco UV-2077 Plus

Eluensek összetétele: A eluens: víz + 0,1% TFA; B eluens: ACN

Mintatérfogat: 10 μ l

I. módszer:

Áramlási sebesség: 1 ml/perc

Állófázis: Phenomenex® Gemini C18 (150/4.60 mm, 5 µm) oszlop

Gradiens: 0 perc: 10% B; 2 perc: 10% B; 10 perc: 90% B; 14 perc: 90% B; 15 perc: 100% B

Detektálás: 214, 254 és 280 nm

Az I. HPLC módszert a crizotinib és crizotinib analógok totálszintézise során reakciókövetésre, a termékek azonosítására és tisztaságának vizsgálatára alkalmaztam.

II. módszer:

Áramlási sebesség: 1,2 ml/perc

Állófázis: Phenomenex® Gemini C18 (150/4.60 mm, 5 µm) oszlop

Gradiens: 0 perc: 0% B; 12 perc: 50% B

Detektálás: 220 nm, 254 nm, 280 nm

A II. HPLC módszert a crizotinib analógok és a crizotinib-GnRH konjugátumok oldhatóság, stabilitás és permeabilitás vizsgálatai során alkalmaztam.

III. módszer:

Áramlási sebesség: 1 ml/perc

Állófázis: Technokroma® Mediterranea Sea C18 column (50/4.0 mm, 3 µm).

Gradiens: 0 perc: 0% B; 12 perc: 50% B

Detektálás: 220 nm, 254 nm, 280 nm

A III. HPLC módszert a FITC-GnRH konjugátumok oldhatóság, stabilitás és permeabilitás vizsgálatai során alkalmaztam.

4.2.3 Tömegspektrometria és ¹H NMR spektrometria

PhD kutatómunkám ideje alatt a Semmelweis Egyetem Orvosi Vegytani Intézetében tömegspektrométer nem állt rendelkezésre. Ezért az előállított vegyületek tömegspektrometriás szerkezetigazolását Dr. Schlosser Gitta (ELTE Analitikai Kémiai Tanszék), Dr. Ludányi Krisztina (SE Gyógyszerészeti Intézet) és Dr. Illyés Eszter (Vichem Chemie Kutató Kft.) végezte. Az ¹H NMR spektrometriás méréseket Dr. Boros Sándor (Vichem Chemie Kutató Kft.) végezte. A készülékek típusát, a vizsgálati módszereket, illetve az eredményeket melléklet tartalmazza.

4.3 Szintézisek

4.3.1 Crizotinib és analógjainak előállítása

MJ1: 1-(2,6-diklór-3-fluorofenil)etanol

5 g 1-2,6-diklór-3-fluoracetofenont (Matrix Scientific, Kolumbia) 40 ml vízmentes metanolban oldottam, 0°C-ra hűtve 1,83 g (2 ekv.) NaBH₄-et adtam hozzá részletekben, ügyelve hogy a hőmérséklet 5°C alatt maradjon. A beadagolás után hagytam szobahőmérsékletűre melegedni a reakcióelegyet, majd 1 órát kevertettem. A reakcióelegyhez 30 ml NH₄Cl telített vizes oldatát adtam, majd 10 percig kevertem. A reakcióelegyet EtOAc-al háromszor extraháltam, az egyesített szerves fázist vízzel kétszer, majd NaCl telített vizes oldatával egyszer kiráztam. A szerves fázist Na₂SO₄-tal vízmentesítettem, majd az oldószert bepárlással eltávolítottam. A termék szintelen olaj.

Termelés: 5 g, 99%. HPLC (I. módszer) t_R =10,36 perc. MS [M+H]⁺=209.

MJ2: 3-[1-(2,6-diklór-3-fluorofenil)etoxi]-2-nitropiridin

Ennél a reakciónál, a racém crizotinib totálszintézise esetén kiindulási anyagnak az általam előállított 1-(2,6-diklór-3-fluorofenil)etanolt (MJ1), az enantiomertiszta crizotinib totálszintézise esetén pedig az (1S)-1-(2,6-diklór-3-fluorofenil)etanolt (Matrix Scientific, Kolumbia) használtam fel.

5 g MJ1 és 3,4 g (1,02 ekv.) 3-hidroxi-2-nitropiridin 45 ml toluolban oldottam, majd hozzáadtam 7,57 g (1,2 ekv.) trifenilfoszfint. -15°C-ra hűtöttem a reakcióelegyet, majd 12,2 ml (1,2 ekv.) 40% (m/m) dietil-azodikarboxilát toluolos oldatát becepegtettem -10°C alatt tartva a hőmérsékletet. Ezután hagytam szobahőmérsékletűre melegedni a reakcióelegyet, amit 2 órán keresztül kevertettem. Pár csepp vizet adtam a reakcióelegyhez és egy órát kevertettem. 0°C-ra hűtöttem a reakcióelegyet, és ezen a hőmérsékleten további egy órát kevertettem. A csapadékot kiszűrtem, toluollal mostam. A szűrletet NaCl telített vizes oldatával kiráztam. A toluolt bepárlással, három részletben etanolra cseréltem. A bepárlást 60°C alatt kell végezni. Az etanolos oldatot 0°C-ra hűtöttem, egy órán keresztül kevertettem, majd kiszűrtem a kikristályosodott terméket. A terméket hideg etanollal mostam, végül vákuumban szárítottam. A termék fehér színű por, ami a kiindulási anyagtól függően a racém, vagy az (R)-MJ2.

Termelés: 6,65 g, 84%. HPLC (I. módszer) t_R =12,13 perc. MS [M+H]⁺=331.

MJ3: 4-(1H-Pirazol-1-il)piridin

35 ml ACN-ben feloldottam 5 g 4-klórpíridin-hidrokloridot és 6,85 g (3 ekv.) 1H-pirazolt adtam hozzá. Reflux hőmérsékleten, nitrogén atmoszférában, 24 órán át kevertettem a reakcióelegyet. 20°C-ra hűtöttem, majd 5,85 ml (1 ekv.) DIPEA-t adtam hozzá. Szobahőmérsékleten kevertettem 30 percig, a kivált csapadékot leszűrtem. A csapadékot mostam 5°C-ra hűtött ACN-el, és EtOAc-al. A terméket vákuumban, 50°C-on szárítottam. A termék fehér színű, szilárd por.

Termelés: 4,56 g, 75%. MS $[M+H]^+=146$.

MJ4: 3-[1-(2,6-diklór-3-fluorofenil)-etoxi]-piridin-2-amin

6 g MJ2-höz 60 ml jégcetet és 60 ml etanolt adtam, majd kevertetés közben hozzáadtam 5 g (5 ekv.) vasport. Reflux hőmérsékletre melegítettem a reakcióelegyet, amit egy órán keresztül kevertettem. Ezt követően hagytam lehűlni a reakcióelegyet, majd 150 ml dietil-étert és 150 ml vizet adtam hozzá. Az oldatot szilárd Na_2CO_3 több részletben történő hozzáadásával semlegesítettem ($\text{pH}>7$), ügyelve az intenzív habzásra és gázképződésre. A fázisokat elválasztottam, a vizes fázist dietil-éterrel még kétszer extraháltam. Az egyesített szerves fázist NaHCO_3 telített vizes oldatával, vízzel, majd NaCl telített vizes oldatával kiráztam, ezután Na_2SO_4 -tal vízmentesítettem. A szerves fázist vákuumban bepároltam, a termék halvány rózsaszínű, kristályos anyag, ami a kiindulási anyagtól függően a racém, vagy az (R)-MJ4.

Termelés: 5,31 g, 99%. HPLC (I. módszer) $t_R=8,29$ perc. MS $[M+H]^+=301$.

MJ5: 5-bróm-3-[1-(2,6-diklór-3-fluorofenil)-etoxi]-piridin-2-amin

5 g MJ4 50 ml DKM oldatát -15°C-ra hűtöttem, majd csepegtetve hozzáadtam 3,05 g (1,05 ekv.) N-brómszukcinimid 20 ml ACN oldatát, a hőmérsékletet -10°C alatt tartva. A reakcióelegyet 10 percig kevertettem, majd 1,6 g (0,5 ekv.) nátrium-metabiszulfít és 50 mg (0,05 ekv.) KOH 10 ml vizes oldatát csepegtetve adtam hozzá, közben a reakcióelegyet hőmérsékletét hagytam 20°C-ra melegedni. Szobahőmérsékleten további 1 órán keresztül kevertettem. A fázisokat elválasztottam, a szerves fázishoz 1,2 ml (1 ekv.) TEA-t adtam, majd vízzel kétszer kiráztam. A DKM-et atmoszférikus nyomáson desztillálva, három részletben metanolra cseréltem. A metanolos oldatot -20°C-ra hűtöttem és 1 napig állni hagytam. A kikristályosodott terméket leszűrtem, vákuumban

szárítottam. A termék világosbarna, porszerű anyag, ami a kiindulási anyagtól függően a racém, vagy az (R)-MJ5.

Termelés: 3,98 g, 63%. HPLC (I. módszer) $t_R=9,33$ perc. MS $[M+H]^+=379$.

MJ6: 4-(1H-Pirazol-1-il)piperidin

2 g MJ3-mat 20 ml vízben oldottam. A hidrogénezési eljárást 20% (m/m) 5%-os Rh/C katalizátorral, 1 ekv. NaH_2PO_4 jelenlétében, 12 bar nyomáson és 50°C-on, 24 órán keresztül végeztük. A reakciót Dr. Hegedűs László (BME Szerves Kémia és Technológia Tanszék) közreműködésével, hidrogénező autoklávban hajtottuk végre. A reakció befejeztével a katalizátort szűrőssel távolítottuk el. A terméket a kapott vizes oldat formájában, további tisztítás nélkül vittem tovább a következő reakcióba. MS $[M+H]^+=152$.

MJ8: di-terc-butil {5-bróm-3-[1-(2,6-diklór-3-fluorfenil)etoxil]piridin-2-il}imidodikarbonát

3 g MJ5 23 ml vízmentes DMF oldatához 5,17 g (3 ekv.) di-terc-butil-dikarbonátot és 0,19 g (0,2 ekv.) N,N-dimetil-4-aminopiridint adtam. A reakcióelegyet szobahőmérsékleten, nitrogén atmoszférában 18 órán keresztül kevertettem, majd 200 ml NaHCO_3 telített vizes oldatát adtam a reakcióelegyhez. A kivált csapadékról a felülúszót dekantáltam, a kivált csapadékot mostam vízzel. A csapadékot dietil-éterben oldottam, amit NaHCO_3 telített vizes oldatával egyszer, vízzel ötször, végül majd NaCl telített vizes oldatával egyszer kiráztam. A szerves fázist Na_2SO_4 -tal vízmentesítettem. Az oldószert bepároltam. A bepárolt anyaghoz 50 ml heptánt adtam, amit kevertetés közben 70-80°C-ra melegítettem. Az oldatot melegen leszűrtem. A szűrletet vákuumban bepárolva kaptam meg a sárgásfehér színű, por állagú terméket, ami a kiindulási anyagtól függően a racém, vagy az (R)-MJ8.

Termelés: 4,21 g, 92%. HPLC (I. módszer) $t_R=14,64$ perc. MS $[M+H]^+=581$.

MJ9B: {6-[bisz(terc-butoxikarbonil)amino]-5-[1-(2,6-diklór-3-fluorfenil)etoxil]piridin-3-il}boronsav

3 g MJ8 30 ml vízmentes DMSO oldatához 1,52 g (3 ekv.) vízmentes kálium-acetátot és 1,84 g (1,4 ekv.) bisz(pinakoláto) diboránt adtam, a reakcióelegyet nitrogénnel inertizáltam, majd bemértem 5% (m/m) Pd(dppf)Cl_2 katalizátort. Nitrogén atmoszféra alatt, 80°C-on 12 órán keresztül kevertettem a reakcióelegyet. A reakcióelegyet

szobahőmérsékletűre hűtöttem, majd EtOAc-al nedvesített celit ágyon átszűrtem, amit ezután EtOAc-al alaposan átmostam. Az szűrletet addig pároltam, amíg olajszerű anyagot kaptam. A bepárolt anyaghoz 150 ml dietil-étert adtam és 300 ml NaHCO₃ telített vizes oldatával kiráztam. Az éteres fázist vízzel háromszor, majd NaCl telített vizes oldatával egyszer kiráztam. A szerves fázist Na₂SO₄-tal vízmentesítettem, majd bepároltam. A terméket 30 ml dietil-éterben oldottam, majd 120 ml hexánt adtam hozzá. Az oldatot refluxhőmérsékletűre melegítettem és 1-2 percig kevertettem, majd a meleg oldatot leszűrtem és a szűrletet bepárolam. A termék barnásfehér színű, hab állagú anyag, ami a kiindulási anyagtól függően a racém, vagy az (R)-MJ9B.

Az LC-MS szerkezetazonosítás alapján (lásd a mellékletben) a termék boronsav-pinakol-észter helyett (MW_{átalagos}: 627,3) boronsav csoportot (MW_{átalagos}: 545,2) tartalmaz.

Termelés: 2,25 g 80%. HPLC (I. módszer) t_R=11,90 perc. MS [M+H]⁺=545.

MJ16: 4-(4-Jód-1H-pirazol-1-il)piperidin

MJ6 vegyületből kiindulva:

20 ml MJ6 vizes oldatát 5°C-ra hűtöttem, 1,18 ml (1 ekv.) cc. sósavat, majd 2,45 g (1,1 ekv.) N-jódszukcinimidet adtam hozzá. A reakcióelegyet szobahőmérsékleten, nitrogén atmoszférában, 30 percig kevertettem. THF-et adtam a reakcióelegyhez, majd a pH-t 40% (m/V) NaOH oldat részletekben történő hozzáadásával lúgosítottam (pH>12), 20°C alatt tartva a hőmérsékletet. A fázisokat elválasztottam egymástól.

A termék tisztítása: A vizes fázist THF/EtOAc 3:1 elegyével háromszor extraháltam, a fázisok szeparálódását szilárd NaCl hozzáadásával segítettem elő. Az egyesített szerves fázisokat bepároltam. Vízmentes THF-ben oldottam újra a bepárolt anyagot, az oldatot leszűrtem, majd a szűrlethez nagyobb mennyiségű EtOAc-ot adtam. Pár perc kevertetés után a kivált csapadékot szűrtem, az anyaglúgot a térfogatának negyedére bepároltam, majd ismét nagyobb mennyiségű EtOAc-ot adtam hozzá. 30 perc kevertetés után a kivált csapadékot ismét szűrtem. A két részletben kiszűrt csapadékot mostam EtOAc-al, végül vákuumban szárítottam. A termék fehér kristályos anyag.

Termelés: 2,70 g, 71% (A katalitikus hidrogénezéssel együtt, MJ3 kiindulási anyagból számolva). HPLC (I. módszer) t_R=7,03 perc. MS [M+H]⁺=278.

MJ101 vegyületből kiindulva:

MJ101-hez TFA/víz 9:1 arányú 5°C-ra hűtött elegyét adtam, majd szobahőmérsékleten 2 órát kevertettem a reakcióelegyet, ezt követően bepároltam. A terméket vízben oldottam, majd a pH-t 40% (m/V) NaOH oldat részletekben történő

hozzáadásával pH=12 körüli értékre állítottam. A termék további feldolgozása megegyezik az MJ6 vegyületből kiinduló reakció esetén leírt tisztítási módszerrel. A termék fehér kristályos anyag.

Termelés: 85%. HPLC (I. módszer) $t_R=7,03$ perc. MS $[M+H]^+=278,0$; számított: 278.

MJ25: di-terc-butil{3-[1-(2,6-diklór-3-fluorfenil)etoxi]-5-(1-piperidin-4-il-1H-pirazol-4-il)piridin-2-il}imidodikarbonát

300 mg MJ9B és 180 mg (1,2 ekv.) MJ16 5,5 ml DMSO oldatához 0,83 ml (3 ekv.) 2M Cs_2CO_3 vizes oldatát adtam. A reakcióelegyet nitrogén gázzal inertizáltam, majd hozzáadtam 5% (m/m) $\text{Pd}(\text{dppf})\text{Cl}_2$ katalizátort. Nitrogén atmoszféra alatt, 80°C-on, 3 órát kevertettem a reakcióelegyet. A szobahőmérsékletűre lehűlt reakcióelegyet MeOH-val nedvesített celit ágyon szűrtem. A celit ágyat MeOH/EtOAc 1:2 elegyével mostam. Az szűrletet addig pároltam, amíg olajszerű anyagot kaptam. A bepárolt anyaghoz 30 ml dietil-étert adtam és 60 ml 10% (m/V) Na_2CO_3 vizes oldatával kiráztam. A fázisokat elválasztottam, a szerves fázist 10% (m/V) Na_2CO_3 vizes oldatával háromszor kiráztam, majd NaCl telített vizes oldatával is kiráztam. A szerves fázist Na_2SO_4 -tal vízmentesítettem, végül bepároltam. A bepárolt anyaghoz 12 ml dietil-étert és 3 ml hexánt adtam. 10 perc keverés után az oldatot leszűrtem. A szűrletet bepároltam, majd a bepárolt anyaghoz 15 ml hexánt adtam, amit keverés közben refluxhőmérsékletre melegítettem. Az oldatot 5°C-on 2 órát állni hagytam. A csapadékot szűrtem, DKM-ben feloldottam, az oldatot bepároltam. A termék sárgásfehér színű, hab állagú anyag, ami a kiindulási anyagtól függően a racém, vagy az (R)-MJ25.

Termelés: 210 mg, 58%. HPLC (I. módszer) $t_R=9,47$ perc. MS $[M+H]^+=650$.

crizotinib: 3-[1-(2,6-diklór-3-fluorfenil)etoxi]-5-(1-piperidin-4-il-1H-pirazol-4-il)piridin-2-amin

210 mg MJ25-höz 4,2 ml TFA/víz 9:1 arányú 5°C-ra hűtött elegyét adtam, amit szobahőmérsékleten 2 órát kevertettem, majd addig pároltam, amíg sűrű olajszerű anyagot kaptam. A bepárolt anyagot pár ml vízben oldottam, a vizes oldatot dietil-éterrel kétszer kiráztam. Az egyesített szerves fázist 0,1M HCl vizes oldatával extraháltam. Az egyesített vizes fázist 5°C-ra hűtöttem, majd 40% (m/V) NaOH vizes oldatával lúgosítottam (pH>10). A vizes oldatot EtOAc és THF 1:1 elegyével egyszer, majd EtOAc-al kétszer extraháltam. Az egyesített szerves fázist kiráztam NaCl telített vizes

oldatával, Na₂SO₄-tal vízmentesítettem, majd bepároltam. A bepárolt anyaghoz 5 ml hexánt adtam, amit kevertetés közben refluxhőmérsékletre melegítettem, majd szobahőmérsékleten 10 percig állni hagytam, ezt követően a hexánt dekantáltam. A bepárolt anyaghoz pár ml DKM-et, majd pár ml hexánt adtam, végül bepároltam. A kapott termék fehér színű, por állagú anyag, ami a kiindulási anyagtól függően a racém, vagy az (R)-crizotinib.

A crizotinibet dihidroklorid só formában is előállítottam. Ebben az esetben a szabad bázist pár csepp DKM-ben oldottam, majd 4 M HCl-dioxánt adtam (10 ekv. HCl feleslegben) az oldathoz. Az oldathoz pár ml hexánt adtam, majd 5 perc elteltével az oldószert dekantáltam, a csapadékot mostam pár ml vízmentes dietil-éterrel, majd vákuumban szárítottam. A kapott termék fehér színű, por állagú anyag.

Termelés: 109 mg, 78% (szabad bázis). HPLC (I. módszer) $t_R=7,52$ perc. MS $[M+H]^+=450$.

MJ26: 5-[4-(4-{6-[bisz(terc-butoxikarbonil)amino]-5-[1-(2,6-diklór-3-fluorfenil)etoxi]piridin-3-il}-1H-pirazol-1-il)piperidin-1-il]-5-oxopentánsav

210 mg MJ25-öt DKM-ben oldottam, 5°C-ra hűtöttem, majd 135 µl (3 ekv.) TEA-t és 40 mg (1,5 ekv.) glutársav-anhidridet adtam hozzá. A reakcióelegyet szobahőmérsékleten 2 óráig kevertettem, ezt követően az oldószert bepárlással eltávolítottam. A bepárolt anyagot 0,1% TFA-t tartalmazó ACN/víz 1:1 arányú elegyében oldottam, majd preparatív HPLC-vel tisztítottam. A preparatív HPLC tisztítást a 4.3.6 fejezetben leírt berendezéssel és eluensekkel hajtottam végre. Az MJ26 vegyületnél az alábbi gradienst alkalmaztam: 0 perc: 50% B, 60 perc: 100% B. Detektálás: 254 nm. A kapott tiszta frakciókat egyesítettem, majd a térfogatának körülbelül ötödére bepároltam. Az oldathoz EtOAc-ot adtam, kirázást követően a fázisokat elválasztottam, a vizes fázist még kétszer EtOAc-al extraháltam. Az egyesített szerves fázist NaCl telített vizes oldatával kiráztam, Na₂SO₄-tal vízmentesítettem, majd az oldószert bepárlással eltávolítottam. A bepárolt anyagot DKM-ben feloldottam, a csapadékot kiszűrtem, az szűrlet bepárlásával kaptam meg a fehér színű, por állagú terméket, ami a kiindulási anyagtól függően a racém, vagy az (R)-MJ26.

Termelés: 108 mg, 43%. HPLC (I. módszer) $t_R=11,65$ perc. MS $[M+H]^+=764$.

MJ30: 2-(4-jód-1 H-pirazol-1-il)etanol

250 mg 4-jódpirazolt 2,5 ml DMF-ben oldottam, 0,9 g (5 ekv.) K_2CO_3 -ot és 2,1 g (5 ekv.) Cs_2CO_3 -ot adtam hozzá, majd 105°C-ra melegítve 30 percig kevertem a reakcióelegyet 0,91 ml (4 ekv.) 2-brómetanolt adtam a reakcióelegyhez, amit 105°C-on 24 órán keresztül kevertettem, nitrogén atmoszférában. Ezt követően újabb 2 ekv. 2-brómetanolt és 5 ekv. K_2CO_3 -at adtam a reakcióelegyhez, amit további 24 órán keresztül kevertettem 105°C-on, nitrogén atmoszférában. A szobahőmérsékletűre hűlt reakcióelegyhez annyi vizet adtam, ami feloldotta a fehér csapadékot. Dietil-éterrel háromszor extraháltam a vizes fázist. A szerves fázist vízzel, majd NaCl telített vizes oldatával kiráztam, Na_2SO_4 -tal vízmentesítettem, ezután bepároltam. A kapott színtelen, olajszerű anyagot DKM/MeOH 95:5 eluenssel, szilikagélen (60 Å, Sigma-Aldrich) oszlopkromatográfiásan tisztítottam. A begyűjtött frakciók VRK-s vizsgálatára DKM/MeOH 95:5 eluenst használtam. A tiszta frakciókat bepároltam. A termék színtelen olaj.

Termelés: 208 mg, 67%. VRK $R_f=0,36$. HPLC (I. módszer) $t_R=7,60$ perc. MS $[M+H]^+=239$.

MJ37: 5-[4-(4-{6-amino-5-[1-(2,6-diklór-3-fluorfenil)etoxil]piridin-3-il}-1H-pirazol-1-il)piperidin-1-il]-5-oxopentánsav MJ37

100 mg MJ26-ot DKM-ben oldottam, az oldathoz 2 ml 4 M HCl-dioxánt adtam, amit ezután két órán keresztül kevertem. A reakcióelegyhez nagyobb mennyiségű hexánt adtam, a csapadékot szűrtem és mostam vízmentes dietil-éterrel, végül vákuumban szárítottam. A termék hidroklorid sója sárgásfehér színű por, ami a kiindulási anyagtól függően a racém, vagy az (R)-MJ37.

Termelés: 51 mg, 65%. HPLC (I. módszer) $t_R=8,11$ perc. MS $[M+H]^+=564$.

MJ39: di-terc-butil {3-[1-(2,6-diklór-3-fluorfenil)etoxi]-5-[1-(2-hidroxietil)-1H-pirazol-4-il]piridin-2-il}imidodikarbonát

300 mg MJ9B és 160 mg (1,2 ekv.) MJ30 DMSO oldatához 0,83 ml (3 ekv.) 2M Cs_2CO_3 vizes oldatát adtam. A reakcióelegyet inertizáltam nitrogén gázzal, majd hozzáadtam 10% (m/m) $Pd(dppf)Cl_2$ katalizátort. Nitrogén atmoszférában, 87°C-on, 24 órán keresztül intenzíven kevertettem a reakcióelegyet. A szobahőmérsékletűre lehűlt reakcióelegyet MeOH-val nedvesített celit ágyon szűrtem. A celit ágyat MeOH/EtOAc 1:2 elegyével mostam. Az szűrletet addig pároltam, amíg világosbarna színű, olajszerű

anyagot nem kaptam. A bepárolt anyagot 30 ml dietil-éterben oldottam, majd 60 ml NaHCO_3 telített vizes oldatával kiráztam. A fázisokat elválasztottam, a szerves fázist vízzel háromszor kiráztam, majd NaCl telített vizes oldatával is kiráztam. A szerves fázist Na_2SO_4 -tal vízmentesítettem, végül bepároltam. A barna színű, olajszerű anyagot DKM/MeOH 92:8 eluenssel, szilikagélen (60 Å, Sigma-Aldrich) oszlopkromatográfiásan tisztítottam. A begyűjtött frakciók VRK-s vizsgálatára DKM/MeOH 92:8 eluent használtam. A tiszta frakciókat bepároltam. A termék világosbarna színű, hab állagú anyag.

Termelés: 170 mg, 50%. VRK $R_f=0,17$. HPLC (I. módszer) $t_R=11,84$ perc. MS $[\text{M}+\text{H}]^+=611$.

MJ40: 2-(4-{6-amino-5-[1-(2,6-diklór-3-fluorfenil)etoxi]piridin-3-il}-1H-pirazol-1-il)etanol

110 mg MJ39-ből kiindulva, a crizotinib esetén leírt szintézismódszer alapján állítottam elő az MJ40 analógot. A kapott termék hidroklorid sója törtfehér színű por.

Termelés: 63 mg, 57%. HPLC (I. módszer) $t_R=7,94$ perc. MS $[\text{M}+\text{H}]^+=411$.

MJ44: 1-(3-kloroprop-1-il)-4-jód-1H-pirazol

250 mg 4-jódpirazolt 5 ml DMF-ben oldottam, 2,1 g (5 ekv.) Cs_2CO_3 -ot adtam hozzá. Szobahőmérsékleten 30 percig kevertettem a reakcióelegyet, majd 380 µl (3 ekv.) 1-brom-3-klórpropánt adtam hozzá. 8 órán keresztül kevertettem a reakcióelegyet, ezt követően 30 ml vizet adtam hozzá, majd 15 ml hexánnal kétszer extraháltam a reakcióelegyet. A szerves fázist NaCl telített vizes oldatával mostam, Na_2SO_4 -tal vízmentesítettem, majd az oldószert bepárlással eltávolítottam. A termék színtelen olaj.

Termelés: 310 mg, 85%. HPLC (I. módszer) $t_R=10,68$ perc. MS $[\text{M}+\text{H}]^+=271$.

MJ46: 2-{[3-(4-iodo-1H-pirazol-1-yl)propyl](methyl)amino}ethanol

290 mg MJ44-hez 0,86 ml (10 ekv.) 2-(Metilamino)etanolt adtam. 70°C-on, 5 órán keresztül kevertettem a reakcióelegyet. 10 ml DKM és 10 ml NaHCO_3 telített vizes oldatát adtam a reakcióelegyhez, majd kirázást követően a fázisokat elválasztottam. A vizes fázist 10 ml DKM-el még egyszer extraháltam. Az egyesített szerves fázist NaCl telített vizes oldatával kiráztam, Na_2SO_4 -tal vízmentesítettem, majd az oldószert bepárlással eltávolítottam. A termék színtelen olaj.

Termelés: 255 mg, 77%. HPLC (I. módszer) $t_R=6,72$ perc. MS $[\text{M}+\text{H}]^+=310$.

MJ50: di-terc-butil {3-[1-(2,6-diklór-3-fluorfenil)etoxi]-5-(1-{3-[2-hidroxietyl](metil)amino]propil}-1H-pirazol-4-il)piridin-2-il}imidodikarbonát

300 mg MJ9B és 205 mg (2 ekv.) MJ46 vegyületekből kiindulva, az MJ25 vegyület esetén leírt szintézismódszer alapján állítottam elő az MJ50 vegyületet. A termék sárgásfehér színű, hab állagú anyag.

Termelés: 190 mg, 53%. HPLC (I. módszer) $t_R=9,36$ perc. MS $[M+H]^+=682$.

MJ53: 5-{2-[4-(4-{6-[bisz(terc-butoxikarbonil)amino]-5-[1-(2,6-diklór-3-fluorfenil)etoxi]piridin-3-il}-1H-pirazol-1-il)piperidin-1-il]etoxi}-5-oxopentánsav

150 mg MJ59-ből kiindulva, az MJ26 vegyület esetén leírt szintézismódszer alapján állítottam elő az MJ53 vegyületet. A termék fehér színű por, ami a kiindulási anyagtól függően a racém, vagy az (R)-MJ53.

Termelés: 87 mg, 50%. HPLC (I. módszer) $t_R=9,65$ perc. MS $[M+H]^+=808$.

MJ54: 2-{[3-(4-{6-amino-5-[1-(2,6-dichloro-3-fluorophenyl)ethoxy]pyridin-3-yl]-1H-pyrazol-1-yl)propyl](methyl)amino}ethanol

170 mg MJ50-ből kiindulva, a crizotinib esetén leírt szintézismódszer alapján állítottam elő az MJ54 analógot. A termék dihidroklorid sója fehér színű, hab állagú anyag.

Termelés: 100 mg, 83% (szabad bázis). HPLC (I. módszer) $t_R=7,40$ perc. MS $[M+H]^+=482$.

MJ55: 2-[4-(4-{6-amino-5-[1-(2,6-diklór-3-fluorfenil)etoxi]piridin-3-il}-1H-pirazol-1-il)piperidin-1-il]etanol

190 mg MJ59 vegyületből kiindulva, a crizotinib esetén leírt szintézismódszer alapján állítottam elő az MJ55 analógot. A kapott termék (szabad bázis) fehér porszerű anyag, ami a kiindulási anyagtól függően a racém, vagy az (R)-MJ55.

Termelés: 105 mg, 78% (szabad bázis). HPLC (I. módszer) $t_R=7,44$ perc. MS $[M+H]^+=494$.

MJ58: 2-[4-(4-jód-1H-pirazol-1-il)piperidin-1-il]etanol

210 mg MJ16-ot 10,5 ml vízmentes THF-ben oldottam, majd 5 ekv. K_2CO_3 -ot adtam hozzá, amit reflux hőmérsékleten 30 percig kevertettem. 4 ekv. 2-brómetanolt adtam a reakcióelegyhez, amit 24 órán keresztül, reflux hőmérsékleten tartva kevertettem. A

szobahőmérsékletűre hűtött reakcióelegyet leszűrtem, a csapadékot mostam vízmentes THF-el. A szűrletet szárazra pároltam. Az anyagot vízmentes THF-ben újra oldottam, majd ismét leszűrtem és a szűrletet bepároltam. A bepárolt anyagot DKM-ben oldottam, majd 4 M HCl-dioxánt adtam hozzá. A kivált fehér csapadékot szűrtem. A csapadékot vízben feloldottam, az oldatot éterrel kiráztam. A vizes fázis pH-ját 40% (m/V) NaOH oldat hozzáadásával lúgosítottam (pH>11), amit DKM-el kétszer extraháltam. A szerves fázist Na₂SO₄-tal vízmentesítettem, majd hexánt adtam hozzá és bepároltam. A termék fehér por.

Termelés: 161 mg, 67%. HPLC (I. módszer) t_R =6,98 perc. MS $[M+H]^+$ =322.

MJ59: di-terc-butyl (3-[1-(2,6-diklór-3-fluorfenil)etoxi]-5-{1-[1-(2-hidroxietyl)piperidin-4-yl]-1H-pirazol-4-yl}piridin-2-yl)imidodikarbonát MJ59

300 mg MJ9B és 210 mg (1,2 ekv.) MJ58-ből kiindulva az MJ25 vegyület esetén leírt szintézismódszer alapján állítottam elő az MJ59 vegyületet. A kapott termék sárgásfehér színű, hab állagú anyag, ami a kiindulási anyagtól függően a racém, vagy az (R)-MJ59.

Termelés: 190 mg, 50%. HPLC (I. módszer) t_R =9,30 perc. MS $[M+H]^+$ =694.

MJ60: 1-(2-klóretil)-4-jód-1H-pirazol

250 mg 4-jódpirazolból kiindulva, az MJ44 vegyület esetén leírt szintézismódszer alapján állítottam elő az MJ60 vegyületet, de ennél a reakciónál reagensnek 350 µl (3 ekv.) 1-bróm-2-klóretánt alkalmaztam. A termék színtelen olaj.

Termelés: 310 mg, 93%. HPLC (I. módszer) t_R =10,16 perc. MS $[M+H]^+$ =257.

MJ61: 2-{[2-(4-jód-1H-pirazol-1-yl)etil](metil)amino}etanol

290 mg MJ60-hoz 0,91 ml (10 ekv.) 2-(Metilamino)etanolt adtam. 48 órát kevertettem a reakcióelegyet, 70°C-on, nitrogén atmoszférában. 10 ml DKM-et és 10 ml NaHCO₃ telített vizes oldatát adtam a reakcióelegyhez, kirázást követően a fázisokat elválasztottam. A vizes fázist DKM-el extraháltam. Az egyesített szerves fázist 10 ml 0,1 M HCl vizes oldatával kétszer extraháltam. Az egyesített vizes fázist DKM-el kiráztam. Az 5°C-ra hűtött vizes fázist szilárd NaHCO₃-al lúgosítottam (pH>8) ügyelve az intenzív gázképződésre, majd DKM-el kétszer extraháltam. A szerves fázist NaCl telített vizes oldatával kiráztam, Na₂SO₄-tal vízmentesítettem, végül bepároltam. A termék színtelen olaj.

Termelés: 220 mg, 67% HPLC (II. módszer) $t_R=6,88$ perc. MS $[M+H]^+=296$.

MJ66: di-terc-butyl {3-[1-(2,6-diklór-3-fluorfenil)etoxi]-5-(1-{2-[(2-hidroxietil)(metil)amino]etil}-1H-pirazol-4-il)piridin-2-il}imidodikarbonát

300 mg MJ9B és 195 mg (2 ekv.) MJ61 vegyületekből kiindulva az MJ25 vegyület esetén leírt szintézismódszer alapján állítottam elő az MJ66 vegyületet. A termék sárgásfehér színű, hab állagú anyag.

Termelés: 200 mg, 66%. HPLC (I. módszer) $t_R=9,30$ perc. MS $[M+H]^+=668$.

MJ67: 2-{[2-(4-{6-amino-5-[1-(2,6-diklór-3-fluorfenil)etoxi]piridin-3-il}-1H-pirazol-1-il)etil](metil)amino}etanol

140 mg MJ66-ból kiindulva a crizotinib esetén leírt szintézismódszer alapján állítottam elő az MJ67 analógot. A termék dihidroklorid sója fehér színű, hab állagú anyag.

Termelés: 90 mg 90% (szabad bázis). HPLC (I. módszer) $t_R=7,38$ perc. MS $[M+H]^+=468$.

MJ71: benzil O-{5-[4-(4-{6-[bisz(terc-butoxikarbonil)amino]-5-[1-(2,6-diklór-3-fluorfenil)etoxi]piridin-3-il}-1H-pirazol-1-il)piperidin-1-il]-5-oxopentanoil}-N-(terc-butoxikarbonil)tirozinát

200 mg MJ26-ot, 120 mg (1,2 ekv.) Boc-Tyr-Obzl-t és 3,2 mg (0,1 ekv.) 4-(N,N-dimetilamino)piridint 10 ml DKM-ben oldottam, 5°C-ra hűtöttem, ezt követően hozzáadtam 65 mg (1,2 ekv.) DCC-t. A reakcióelegyet szobahőmérsékleten 2 órát kevertettem. A kivált csapadékot szűréssel eltávolítottam. A szerves fázist NaHCO_3 telített vizes oldatával háromszor kiráztam, Na_2SO_4 -tal vízmentesítettem, az oldószert bepárlással eltávolítottam. A terméket oszlopkromatográfiásan tisztítottam, a kiindulási hexán/EtOAc 1:5 arányt 100% EtOAc-ig növelve. A begyűjtött frakciók VRK-s vizsgálatára EtOAc eluent használtam. A tiszta frakciókat bepároltam. A termék fehér kristályos anyag.

Termelés: 204 mg, 70%. VRK $R_f=0,35$. HPLC (I. módszer) $t_R=13,45$ perc. MS $[M+H]^+=1117$.

MJ72: O-{5-[4-(4-{6-[bisz(terc-butoxikarbonil)amino]-5-[1-(2,6-diklór-3-fluorfenil)etoxi]piridin-3-il}-1H-pirazol-1-il)piperidin-1-il]-5-oxopentanoil}-N-(terc-butoxikarbonil)tirozin

130 mg MJ71-et MeOH-ban oldottam, nitrogén interizálást követően hozzáadtam 13 mg Pd/C 10% (m/m) katalizátort. Ezt követően a hidrogén gázt folyamatosan buborékoltattam a reakcióelegybe, amit légköri nyomáson, szobahőmérsékleten, 3 órán keresztül intenzíven kevertettem. A katalizátort szűrővel eltávolítottam, az oldószert bepárlással eltávolítottam. A termék fehér porszerű anyag.

Termelés: 108 mg, 90%. HPLC (I. módszer) t_R =12,63 perc. MS $[M+H]^+$ =1027.

MJ75: 4-nitrofenil 4-(4-{6-[bisz(terc-butoxikarbonil)amino]-5-[1-(2,6-diklór-3-fluorfenil)etoxi]piridin-3-il}-1H-pirazol-1-il)piperidin-1-karboxilát

250 mg MJ25-öt DKM-ben oldottam. Hozzáadtam 67 ml (2 ekv.) DIPEA-t, majd 235 mg (2 ekv.) bisz(4-nitrofenil) karbonátot. Nitrogén atmoszférában 3 órán keresztül kevertettem a reakcióelegyet. A reakcióelegyet bepároltam, a terméket oszlopkromatográfiásan tisztítottam. Gradiens: kiindulási hexán/EtOAc 1:1 arányt 1:3-ra növeltem. A begyűjtött frakciók VRK-s vizsgálatára hexán/EtOAc 1:2 eluenst használtam. A tiszta frakciókat bepároltam. A termék szintelen amorf anyag.

Termelés: 230 mg, 74%. VRK R_f = 0,17. HPLC (I. módszer) t_R =13,68 perc. MS $[M+H]^+$ =815.

MJ76: 4-aminofenil 4-(4-{6-[bisz(terc-butoxikarbonil)amino]-5-[1-(2,6-diklór-3-fluorfenil)etoxi]piridin-3-il}-1H-pirazol-1-il)piperidin-1-karboxilát MJ76

200 mg MJ75-öt metanolban oldottam, nitrogén interizálást követően hozzáadtam 20 mg Pd/C 10% (m/m) katalizátort. Ezt követően a hidrogén gázt folyamatosan buborékoltattam a reakcióelegybe, amit légköri nyomáson, szobahőmérsékleten, 6 órán keresztül intenzíven kevertettem. A katalizátort szűrővel eltávolítottam. A szűrletet bepároltam. Az EtOAc fázist NaHCO_3 teltett vizes oldatával, majd vízzel kiráztam. A szerves fázist Na_2SO_4 -tal vízmentesítettem, majd bepároltam. A termék fehér kristályos anyag.

Termelés: 184 mg, 96%. HPLC (I. módszer) t_R =9,88 perc. MS $[M+H]^+$ =785.

MJ77: 5-([4-(4-(6-(bisz(terc-butoxikarbonil)amino)-5-[1-(2,6-diklór-3-fluorfenil)etoxi]piridin-3-il)-1H-pirazol-1-il)piperidin-1-il]karbonil}oxi)fenil]amino)-5-oxopentánsav

115 mg MJ76-ból kiindulva az MJ26 esetén leírt szintézismódszer alapján állítottam elő az MJ77 vegyületet.

Termelés: 78 mg, 61%. HPLC (I. módszer) $t_R=12,04$ perc. MS $[M+H]^+=899$.

MJ95: 4-aminofenil 4-(4-(6-amino-5-[1-(2,6-diklór-3-fluorfenil)etoxi]piridin-3-il)-1H-pirazol-1-il)piperidin-1-karboxilát

100 mg MJ76-ból kiindulva a crizotinib esetén leírt szintézismódszer alapján állítottam elő az MJ95 analógot.

Termelés: 40 mg, 55%. HPLC (I. módszer) $t_R=7,84$ perc, tisztaság: 91%. MS $[M+H]^+=585$.

MJ100: terc-butil 4-[(metilszulfonil)oxi]piperidin-1-karboxilát

90 ml DKM-ben oldottam 8 g 1-Boc-4-hidroxipiperidint és 13,87 ml (2,5 ekv.) TEA-t adtam hozzá. 0°C-ra hűtöttem a reakcióelegyet, majd 5,69 ml (1,85 ekv.) metánszulfonil-kloridot (MsCl) adtam hozzá részletekben, tartva a 0°C körüli hőmérsékletet. A reakcióelegyet hagytam szobahőmérsékletűre melegedni, majd 1 órát kevertettem. A reakcióelegyet vízzel kétszer kiráztam, majd NaCl telített vizes oldatával is kiráztam. A szerves fázist Na₂SO₄-tal vízmentesítettem, végül az oldószert bepároltam. A termék fehér kristályos anyag.

Termelés: 10,33 g, 93%. MS $[M+H]^+=280$.

MJ101: terc-butil 4-(4-jód-1H-pirazol-1-il)piperidin-1-karboxilát

3,16 g 4-jódpirazol DMF oldatát 5°C-ra hűtöttem, majd 7,95 g (1,5 ekv.) Cs₂CO₃-ot adtam hozzá. 5°C-on, 30 percig kevertettem a reakcióelegyet, majd hozzáadtam 5 g (1,1 ekv.) MJ100-at. 105°C-ra melegítettem a reakcióelegyet, majd ezen a hőmérsékleten egy éjszakán át kevertem, nitrogén atmoszféra alatt. A szobahőmérsékletűre lehűtött reakcióelegyhez vizet adtam, amit dietil-éterrel háromszor extraháltam. Az egyesített szerves fázist Na₂SO₄-tal vízmentesítettem, bepároltam. A terméket petroléter/EtOAc 5:1 eluenssel, szilikagélen (60 Å, Sigma-Aldrich) oszlopkromatográfiásan tisztítottam. A begyűjtött frakciók VRK-s vizsgálatára petroléter/EtOAc 5:1 eluenst használtam. A tiszta frakciókat bepároltam. A termék fehér kristályos anyag.

Termelés: 3,81 g, 62%. VRK $R_f=0,13$. HPLC (I. módszer) $t_R=11,81$ perc. MS $[M+H]^+=322$.

4.3.2 GnRH analógok előállítása, a peptidlánc felépítése

A GnRH analógok szilárd fázisú peptidszintézise Fmoc módszerrel, H-Rink Amide ChemMatrix® gyantán (Sigma-Aldrich, katalógusszám: 727768, kapacitás: 0,4-0,6 mmol/g), manuálisan, szűrővel ellátott fecskendőben történt. Az aminosavak kapcsolása DMF-ben, szobahőmérsékleten, 20 percig, 3 ekv. aminosav, 3 ekv. COMU és 6 ekv. NMM jelenlétében történt. A kapcsolások előtt a védett aminosav-származékot és a COMU-t az NMM-et tartalmazó DMF-ben feloldottam, majd 1-2 perces előaktiválást követően hozzáadtam a gyantához. Az FMOC védőcsoport eltávolítása 20% piperidint tartalmazó DMF-ben történt, háromszori ismétléssel, 2, 5 majd 10 percig. Minden kapcsolás és védőcsoport-eltávolítás után a gyantát DKM-el, MeOH-val, majd kétszer DMF-el mostam, ebben a sorrendben.

Felhasznált, védett aminosav-származékok:

Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-D-Lys(Alloc)-OH, Fmoc-Tyr(tBu)-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Trp(Boc)-OH, Fmoc-His(Trt)-OH, Fmoc-Lys(ivDde)-OH, Fmoc-Asp(OtBu)-OH, L-pGlu-OH

Ninhidrin (Kaiser-) teszt:

A védett aminosav-származékok megfelelő kapcsolódását Kaiser-teszttel ellenőriztem. Az alkalmazott reagensek: A oldat: 0,2 ml 0,01 M KCN vizes oldata 10 ml piridinben; B oldat: 500 mg ninhidrin 10 ml absz. etanolos oldata; C oldat: 40 g fenol 10 ml absz. etanolos oldata.

A gyanta kis részletét mostam MeOH-val és dietil-éterrel, majd kémcsőbe tettem, és az A, B és C reagensekből két-két cseppet adtam hozzá. Az így kapott sárga színű oldatot 5 percig 100°C-on inkubáltam. A kék elszíneződés szabad aminosavak jelenlétére utal (kivéve a prolint), a változatlan sárga szín negatív eredményt jelez.

Alloc védőcsoport szelektív eltávolítása:

A peptidet tartalmazó gyantát nitrogénnel inertizáltam, majd 20 ekv. PhSiH_3 -t és 10% (m/m) $\text{Pd(PPh}_3)_4$ katalizátort adtam hozzá DKM:DMF 2:1 arányú elegyében. Nitrogén atmoszféra alatt 2 órát kevertettem. A gyantát 0,5% DIPEA-t tartalmazó DMF-

el mostam. A katalizátort 0,5% (m/V) nátrium-dietil-ditiokarbamátot tartalmazó DMF-el, háromszori mosással távolítottam el. Ezt követően a gyantát DKM/DMF 1:1 elegyével háromszor, majd DMF-el egyszer mostam. Az alloc védőcsoport eltávolítását Kaiser-tesztel is ellenőriztem.

ivDde védőcsoport szelektív eltávolítása:

Az ivDde védőcsoportot 2% (V/V) hidrazin-hidráttal tartalmazó DMF oldatával távolítottam el. A hasítást 2*10 percig végeztem, szobahőmérsékleten, majd DMF-el háromszor mostam a gyantát. Az ivDde védőcsoport eltávolítását Kaiser-tesztel is ellenőriztem.

4.3.3 Fluoreszcens jelölés

A fluoreszcens jelölést a peptidlánc felépítése és az ivDde, illetve alloc védőcsoportok szelektív eltávolítása után végeztem el. 100 mg gyantához (a peptidet nem tartalmazó, kiindulási gyanta tömegére vonatkoztatva, $\sim 5 \cdot 10^{-5}$ mol) 25 mg ($\sim 1,1$ ekv.) FITC-et piridin/DMF/DKM 12:7:5 arányú elegyében oldottam, majd hozzáadtam a gyantához. Nitrogén atmoszféra alatt, szobahőmérsékleten, egy éjszakán keresztül kevertettem a reakcióelegyet.

Az előállított konjugátumok:

FITC + D-Lys ⁶ -GnRH-I	=	[D-Lys ⁶ (FITC)]-GnRH-I	(25 mg)
FITC + D-Lys ⁶ -GnRH-II	=	[D-Lys ⁶ (FITC)]-GnRH-II	(29 mg)
FITC + GnRH-III	=	[Lys ⁸ (FITC)]-GnRH-III	(21 mg)

4.3.4 Crizotinib analógok konjugálása

A crizotinib analógok kapcsolását az ivDde, vagy alloc védőcsoport szelektív eltávolítása után végeztem el. A kapcsolások előtt az adott crizotinib analógot és a COMU kapcsolószert az NMM-et tartalmazó DMF-ben feloldottam, majd 1-2 perces előaktiválást követően hozzáadtam a gyantához (~ 100 mg gyanta, a peptidet nem tartalmazó, kiindulási gyanta tömegére vonatkoztatva, $\sim 5 \cdot 10^{-5}$ mol). A kapcsolat szobahőmérsékleten, 1 órán keresztül, 2 ekv. hatóanyag (10^{-4} mol), 2 ekv. COMU és 4 ekv. NMM jelenlétében történt.

Az előállított konjugátumok:

MJ26 + D-Lys ⁶ -GnRH-I	=	[D-Lys ⁶ (crizotinib)]-GnRH-I	(28 mg)
MJ72 + D-Lys ⁶ -GnRH-I	=	[D-Lys ⁶ (MJ37)]-GnRH-I	(17 mg)
MJ53 + D-Lys ⁶ -GnRH-I	=	[D-Lys ⁶ (MJ55)]-GnRH-I	(20 mg)
(R)-MJ53 + GnRH-III	=	[Lys ⁸ ((R)-MJ55)]-GnRH-III	(15 mg)
MJ77 + D-Lys ⁶ -GnRH-I	=	[D-Lys ⁶ (MJ95)]-GnRH-I	(17 mg)

4.3.5 GnRH analógok és konjugátumok hasítása a gyantáról

A GnRH analógokat és a GnRH konjugátumokat egyaránt TFA/fenol/víz/tioanizol/triizopropilszilán 82,5:5:5:5:2,5 arányú eleggyel, 2 órán keresztül, szobahőmérsékleten hasítottam a gyantáról. A savas hasítás az aminosavak oldalláncán található további védőcsoportokat is eltávolítja. A terméket tartalmazó hasítóelegyet -20°C-ra hűtött dietil-éterbe szűrtem. Az éterben kivált csapadékot centrifugáltam (10 perc, 13000 g), a felülúszót dekantáltam. A csapadékot vízmentes dietil-éterben felfuszpendáltam, centrifugáltam, majd dekantáltam. Az éteres mosást megismételtem. A terméket vákuumban szárítottam.

4.3.6 GnRH analógok és konjugátumok tisztítása, liofilizálása

A GnRH peptidek és konjugátumok tisztítását preparatív HPLC-vel végeztem.

HPLC típusa: Jasco PU-980 (2 db); Jasco UV-975; Mintaadagoló: manuális

A tisztítások során használt módszer:

Áramlási sebesség: 10 ml/perc

Állófázis: Phenomenex Gemini C18 oszlop (150/21,4 mm, 5 µm)

Eluens: A eluens: víz + 0,1% TFA; B eluens: ACN/víz 9:1 + 0,1% TFA

Gradiens: 0 perc: 0% B; 5 perc: 20% B; 50 perc: 40% B

Detektálás: 220 nm

A tiszta terméket tartalmazó frakciókat egyesítettem, 30°C alatt vákuumban bepároltam, majd a bepárolt anyagot 10% ecetsavat tartalmazó vízben oldottam, végül a vizes oldatokat liofilizáltam. A FITC-GnRH konjugátumok citromsárga színű, a GnRH analógok és a crizotinib-GnRH konjugátumok fehér színű és por állagú anyagok.

4.4 Oldhatóság vizsgálat

Az oldhatóságot PBS-ben (Lonza; pH=7,4; Ca^{2+} - és Mg^{2+} -mentes; katalógusszám: BE17-516F), 25°C-on, vagy szérummentes RPMI sejttenyésztő médiumban (Lonza, katalógusszám: BE12-702F) 37°C-on mértem. A 10 mM koncentrációjú DMSO törzsoldatokból 200 μM elméleti koncentrációjú oldatokat készítettem. A mintákat PBS esetén 25°C-on, sejttenyésztő médium esetén 37°C-on inkubáltam, majd 2 óra elteltével kétszer centrifugáltam őket (13000 g, 10 perc). A felülúszóból kivett mintákat HPLC-vel mértem. A kinetikai oldhatóságot ACN/ H_2O 1:1 arányú elegyében elkészített kalibráló sor segítségével, külső standard módszerrel, Excel szoftver (Microsoft Office Pro 2013) segítségével számítottam ki.

4.5 Permeabilitás vizsgálat

4.5.1 PAMPA

A PAMPA egy elfogadott módszer a hatóanyagok sejtmembránon keresztül történő passzív transzportjának modellezésére, *in vitro* körülmények között. A mesterséges membránokat (BD Gentest™ Pre-Coated PAMPA plate, termékazonosító kód: 353015) a Vichem Chemie Kutató Kft. szolgáltatta. A 10 mM koncentrációjú DMSO törzsoldatokból 40 μM elméleti koncentrációjú PBS oldatokat készítettem és beletöltöttem a donor lyukakba. Kontrollnak a fluoreszcein Na-sóját (Sigma-Aldrich) és koffeint (Sigma-Aldrich) alkalmaztam. Az akceptor lyukakkal egyesített rendszert termosztált rázózálogára (BioSan Thermo-Shaker PST-60HL) helyeztem. Az inkubálási paraméterek: 250 rezgés/perc, 5 óra és 25°C. Az inkubálás után a donor és az akceptor lyukak abszorbanciáját UV-VIS spektrofotométerrel (BioTek Synergy 2 Multi-Mode Reader) mértem 250-500 nm hullámhossz-tartományban. A permeabilitást a 280 nm-en mért abszorbancia értékek alapján, a gyártó által megadott és a mellékletben is megtalálható képlet szerint számoltam ki. A számításokhoz Excel szoftvert (Microsoft Office Pro 2013) használtam.

4.5.2 MDCK

Az MDCK sejteket speciális 24 lyukú lemezekre (Costar® Transwell® Permeable Support 24 well plate, termékazonosító kód: 3422) helyeztük, 10^5 sejt/lyuk mennyiségben. A teljesen konfluens sejtréteg eléréséhez 4 napig növesztettük a sejteket.

A konfluenciát vezetőképesség méréssel ellenőriztem (EVOM2 Epithelial Voltohmmeter for TEER, World Precision Instruments). A 10 mM koncentrációjú DMSO törzsoldatokból 10 μ M koncentrációjú HBSS (Hank's Balanced Salt Solution, pH=7,4) oldatokat készítettem, majd a megfelelő donor lyukakba töltöttem őket. Az akceptor lyukakkal egyesített rendszert termosztált rázóátalára (BioSan Thermo-Shaker PST-60HL) helyeztem. Az inkubálási paraméterek: 250 rezgés/perc, 1 óra és 25°C. A donor és akceptor lyukak koncentrációját HPLC-vel mértem meg.

4.6 Stabilitás vizsgálat

Az előállított vegyületek stabilitását 10% FBS-t tartalmazó RPMI sejttenyésztő médiumban mértem. A 10 mM koncentrációjú DMSO törzsoldatokból 10 μ M elméleti koncentrációjú oldatokat készítettem. A mintákat 37°C-on, 2, 6 és 24 órán keresztül inkubáltam. Az inkubálás lejártával a mintákhoz a médium térfogatával megegyező mennyiségű ACN-t adtam. A mintákat kémcsőrázóval homogenizáltam, majd kétszer centrifugáltam (13000 g, 10 perc). A felülúszóból kivett mintákat HPLC-vel analizáltam. A minták koncentrációjának kiszámítását ACN/H₂O 1:1 arányú elegyében elkészített kalibráló sor segítségével, külső standard módszerrel, Excel szoftver (Microsoft Office Pro 2013) segítségével végeztem. A felezési idők kiszámításához GraphPad Prism szoftvert használtam.

A patkány májsejtek lizoszóma preparátumában mért stabilitást Dr. Schlosser Gitta (ELTE Analitikai Kémiai Tanszék) végezte. A mérési módszert a melléklet tartalmazza.

4.7 Sejtkultúrák

A kísérletek során használt sejtvonalak közül az EBC-1 (tüdőrák) sejtvonalat a JRCB-től (Japanese Collection of Research Bioresources Cell Bank) vásároltuk, az NIH/3T3 (egér fibroblaszt), LNCaP (prosztatarák), MCF-7 (emlőrák), BxPC-3 (hasnyálmirigyrák), HT-29 (vastagbélrák) és Detroit-562 (garatrák) sejtvonalakat az ATCC-től (American Type Culture Collection) vásároltuk. Az MDCK (Madin–Darby canine kidney) sejtvonalat Alfred Schinkel (Netherlands Cancer Institute, Amsterdam, Hollandia), a H-1993 (tüdőrák) és H-2228 (tüdőrák) sejtvonalakat pedig a Vichem Chemie Kutató Kft. biztosította számunkra. A sejtkultúrákat a JRCB, illetve az ATCC által ajánlott sejttenyésztő médiumban tartottuk fennt. A sejttenyésztő médiumot 10% (V/V) FBS-el (Euro Clone, katalógusszám: ECS0180L) és antibiotikummal (MycoZap

Plus-CL, Lonza, katalógusszám: VZA-2012) egészítettük ki. Az így elkészített sejtenyésző médium a teljes médium. A sejt kultúrákat párásított inkubátorban, 5% CO₂ atmoszféra alatt, 37°C-on tartottuk fent.

A letapadt sejteket sejtenyésző flaskában (VWR International, katalógusszám: 10062-872) körülbelül 80%-os konfluenciáig növesztettük. A sejt vonalakkal végzett kísérletek megkezdése előtt, a sejtekről a médiumot eltávolítottuk és PBS mosást követően, 1 ml tripszin-EDTA oldatot (Lonza, katalógusszám: BE17-161E) adunk hozzájuk. A sejteket 37°C-on addig inkubáltuk, amíg fel nem úsztak a flaska aljáról (körülbelül 10 perc). A sejtekhez további 9 ml teljes médiumot adtunk, majd falcon-csőbe helyeztük át őket és 150 g-vel 4 percig centrifugáltuk. A felülúszót dekantáltuk, majd a sejteket 3 ml teljes médiumban óvatosan felfuszpendáltuk. A sejtszámot automata sejtszámlolóval (Countess® Automated Cell Counter, Invitrogen) határoztuk meg és ezt követően helyeztük ki a szükséges mennyiségű sejteket az adott kísérlethez. A sejt vonalak fenntartását, illetve az EBC-1 és NIH/3T3 sejtek crizotinib analógokkal és konjugátumokkal történő kezelését Bökönyi Gyöngyi (MTA-SE Patobiokémiai Kutatócsoport) végezte.

4.8 Western blot analízis

A GnRH-R fehérje jelenlétét, továbbá a GnRH konjugátumok GnRH-R-kötődését western blot analízissel vizsgáltuk. A sejteket 6 lyukú lemezre raktuk ki és teljes médiumban, 5% CO₂ atmoszféra alatt, 37°C-on, 80-90% konfluencia szint eléréséig növesztettük. A GnRH-R-kötődés vizsgálat estén a konjugátumokkal 15 percig, 1 µM koncentrációban kezelt sejtekről, a GnRH-R fehérje kimutatása esetén pedig a kezeletlen sejtekről a médiumot eltávolítottuk, kétszer mostuk PBS-sel. A sejteket jég hideg, proteáz és foszfatáz inhibitorokkal kiegészített RIPA-pufferben (50 mM NaF-dal, 1 mM DTT-vel, 1 mM Na₃VO₄-tal és 0,5 % (V/V) proteáz inhibitorral (Calbiochem®, katalógusszám: 539134) kiegészített RIPA-puffer) lizáltuk. A sejteket gumikaparóval felkapartuk, a szuszpenziót eppendorf csövekbe mértük, majd jégen négyszer 10 másodpercig szonikáltuk, és további 30 percig jégen tartottuk. Ezután a lizátumokat 4°C-on 13000 g-vel 15 percig centrifugáltuk, a felülúszót megtartottuk, és ezzel dolgoztunk tovább. A fehérjekoncentrációt Bradford-módszerrel határoztuk meg, a maradék mintához pedig 5x töménységű Laemmli-puffert adtunk és a fehérjéket 100°C-on 5 percig denaturáltuk. A mintákból a 20-40 µg fehérjét vittünk fel az SDS-tartalmú poliakrilamid gélek (12 % akrilamid-tartalom) zsebeibe, majd 130 V feszültség mellett futtattuk. Ezt követően a

gélből a fehérjét polivinilidén-difluorid (PVDF) membránokra transzferáltuk 400 mA áramerősség mellett, jégben hűtve. A transzferálás után a PVDF membránt 5% (m/V) tejpor-tartalmú TBST-ben (Tris-(hidroximetil) aminometán-pufferes sóoldat és 0,1% (m/V) Tween 20 detergens, pH=7,4) blokkoltuk 1 órán keresztül szobahőmérsékleten. Az elsődleges ellenanyagokat 1% (m/V) BSA és 0,1% (m/V) nátrium-azid tartalmú TBST-ben hígítottuk ki és a membránokat egy éjszakán keresztül 4°C-on inkubáltuk benne. A felhasznált elsődleges ellenanyagok: GnRH-R (Proteintech™, katalógusszám: 19950-1-AP, hígítás 1:4000), α -tubulin (Sigma-Aldrich, katalógusszám: T9026, hígítás 1:10000), foszfo-T202/Y204-Erk1/2 (Cell Signaling Technology®, katalógusszám: 4370, hígítás 1:2000), Erk1/2 (Cell Signaling Technology®, katalógusszám: 9107, hígítás 1:2000). A következő napon a membránokat háromszor 5-10 percig mostuk TBST-ben, majd 1% (m/V) tejporthoz tartozó TBST-ben kihígított másodlagos ellenanyag oldatban inkubáltuk 1 órán keresztül szobahőmérsékleten. A másodlagos ellenanyagok: anti-nyúl IgG (Cell Signaling Technology®, katalógusszám: 7074, hígítás 1:2000), és anti-egér IgG (Cell Signaling Technology®, katalógusszám: 7076, hígítás 1:8000). Az inkubálást követően háromszor mostuk a membránokat TBST-vel. A detektálásra tormaperoxidáz-alapú kemilumineszcens (ECL) módszert alkalmaztunk. A western blot analíziseket Dr. Varga Attilával (MTA-SE Patobiokémiai Kutatócsoport) közösen végeztük.

4.9 Sejt-életképesség meghatározás

4.9.1 MTT

A sejteket 96 lyukú lemezre helyeztük ki (10^4 sejt/lyuk), majd 24 órán keresztül inkubáltuk 5% CO₂ atmoszféra alatt, 37°C-on. Teljes médiumban hígítási sort készítettünk a kezelőszert tartalmazó 10 mM DMSO törzsoldatokból. A hígítási sorból egyenként 50 μ l-t adtuk a lyukanként 150 μ l teljes médiumot és a kezelendő sejteket tartalmazó lemezre. Ezek a kezelt minták. Hat darab, sejteket tartalmazó lyukba a legtöményebb kezelőszeres mintákkal megegyező mennyiségű DMSO-t tartalmazó teljes médiumot tettünk, ez volt a DMSO kontroll minta. A sejteket 24 órán keresztül kezeltük. A kezelést követően a médiumot óvatosan eltávolítottuk, majd 50 μ l 1 mg/ml MTT reagenst (Sigma-Aldrich) tartalmazó PBS oldatot adtunk a sejtekhez. A sejteket 2 óráig inkubáltuk 37°C-on, majd az MTT reagenst óvatosan eltávolítottuk. A képződött formazán kristályokat 10% Triton X-100 és 1% 0,1 M HCl tartalmú izopropanolban

oldottuk fel. Az oldatok abszorbanciáját 570 nm és 635 nm-en mértük (BioTek Synergy 2 Multi-Mode Reader). Lyukanként a 635 nm hullámhosszon mért abszorbanciaértékekből kivontam az 570 nm-en mért értékeket. Az így kapott adatokból számítottam ki a kezelt sejtek DMSO kontroll sejtekhez viszonyított százalékos értékét, ami a sejtek enzim aktivitását, ezáltal a sejtek életképességét tükrözi. Az adatok kiértékeléshez Excel szoftvert (Microsoft Office Pro 2013) használtam. Az IC₅₀ értékek számítását GraphPad Prism szoftverrel végeztem el.

4.9.2 CellTiter-Glo®

A sejteket 96 lyukú lemezre helyeztük (10³ sejt/lyuk), majd 24 órán keresztül inkubáltuk 5% CO₂ atmoszféra alatt, 37°C-on. Teljes médiumban hígítási sort készítettünk a kezelőszert tartalmazó 10 mM DMSO törzsoldatokból. A pozitív kontrollként alkalmazott (R)-crizotinib esetén a Selleck Chemicals-tól vásárolt hatóanyagot (katalógusszám: S1068) alkalmaztuk. A hígítási sorból egyenként 50 µl-t adtuk a lyukanként 150 µl teljes médiumot és a kezelendő sejteket tartalmazó lemezre. Ezek a kezelt minták. Három, sejteket nem tartalmazó lyukba kezelőszer-mentes, teljes médiumot tettünk, ez a vak (háttér) minta. Hat, sejteket tartalmazó lyukba a legtöményebb kezelőszeres mintákkal megegyező mennyiségű DMSO-t tartalmazó teljes médiumot tettünk, ez a DMSO kontroll minta. A sejteket 72 órán keresztül kezeltük. A kezelést követően a médiumot eltávolítottuk, majd CellTiter-Glo® reagenst (Promega) tartalmazó médiumot adtunk a sejtekhez. 5 perc sötétben történő rázatás után a lemezen lévő oldatok lumineszcenciáját lemértük (BioTek Synergy 2 Multi-Mode Reader). A lyukanként lemért lumineszcencia értékekből kivontam a vak minták átlagának az értékét. Az így kapott adatokból számítottam ki a kezelt sejtek DMSO kontroll sejtekhez viszonyított százalékos értékét, ami a sejtekben található ATP mennyiségét, ezáltal a sejtek életképességét tükrözi. Az adatok kiértékeléshez Excel szoftvert (Microsoft Office Pro 2013) használtam. Az IC₅₀ értékek számítását GraphPad Prism szoftverrel végeztem el.

4.10. Konfokális lézer pásztázó mikroszkóp (CLSM)

A sejteket 8 lyukú mikroszkópos tárgylemezre (Ibidi® µ-Slide 8 Well microscopic slides, Zenon Bio Kft., katalógusszám: 80826) raktuk ki, 10⁴ sejt/lyuk mennyiségben. A sejteket teljes médiumban, 37°C-on, 48 óráig inkubáltam. A sejtekről a felvételeket az adott kezelési módszert követően, inverz konfokális lézer pásztázós mikroszkóppal (Zeiss

Confocal LSM 710), 63x olaj immerziós objektív alatt készítettem. A FITC-GnRH konjugátumok és az Alexa Fluor® 546 gerjesztése 488 nm lézerrel, a Lysotracker™ Red DND-99 gerjesztése 543 nm lézerrel, a Draq5™ gerjesztése 633 nm lézerrel történt. A felvételek kiértékeléséhez és a képek elkészítéséhez a Zen 2.3 szoftvert (Carl Zeiss Microscopy GmbH) használtam.

4.10.1 GnRH-R vizsgálata immuncitokémiai módszerrel

A mikroszkópos tárgylemezre letapadt sejteket 4% paraformaldehid metanolos oldatával 10 percig fixáltam szobahőmérsékleten. (A sejtek esetleges permeabilizálására ebben a fázisban került sor, 0,1% Triton X-100 (Sigma-Aldrich) PBS oldatával, 10 percig szobahőmérsékleten inkubálva.) PBS mosás után, szobahőmérsékleten 1 óráig 5% (m/V) BSA (Sigma-Aldrich, katalógusszám: A7906-10G) PBS oldatával inkubáltam. PBS mosás után, GnRH-I-R elsődleges antitesttel (Proteintech™, katalógusszám: 19950-1-AP), szobahőmérsékleten 1 órán át inkubáltam (1:100 hígítás). A kontroll sejtek esetén elsődleges antitesttel nem kezeltem. PBS mosás után, Alexa Fluor® 546 jelölt másodlagos antitesttel (Thermo Fisher Scientific, katalógusszám: A-11035), szobahőmérsékleten 1 órán át inkubáltam (1:500 hígítás). PBS mosás után 5 µM Draq5™ (Thermo Fisher Scientific, katalógusszám: 62254) fluoreszcens sejtmagfestéssel, 10 percig, szobahőmérsékleten inkubáltam a sejteket. Kétszer mostam PBS-el, végül pár csepp mounting médiumot (Sigma-Aldrich, katalógusszám: F4680) adtam a sejtekhez.

4.10.2 FITC-GnRH konjugátumok vizsgálata

A mikroszkópos tárgylemezre letapadt sejteket FITC-GnRH analógokkal 10 µM, vagy 1 µM koncentrációban, 5 órán keresztül inkubáltam 5% CO₂ atmoszféra alatt, 37°C-on. A kontroll sejteket 10 µM fluoreszceinnel kezeltem. A kezelés után PBS-el mostam a sejteket, majd 4% paraformaldehid metanolos oldatával 10 percig fixáltam szobahőmérsékleten. PBS mosás után 5 µM Draq5™ sejtmagfestéssel, 10 percig, szobahőmérsékleten inkubáltam a sejteket. Kétszer mostam PBS-el, végül pár csepp mounting médiumot adtam a sejtekhez.

4.10.3 FITC-GnRH konjugátumok és GnRH-I-R egyidejű vizsgálata

A mikroszkópos tárgylemezre letapadt sejteket 10 µM [D-Lys⁶(FITC)]-GnRH-I konjugátummal, 1 órán keresztül inkubáltam, 5% CO₂ atmoszféra alatt, 37°C-on. Ezt követően eltávolítottam a kezelőszeres médiumot és kezelőszer-mentes médiummal

további 1 óráig inkubáltam a sejteket. A további lépések a GnRH-R immuncitokémiai jelölése „A GnRH-R vizsgálata immuncitokémiai módszerrel” fejezetben leírtakkal megegyező módon történtek.

4.10.4 FITC-GnRH konjugátumok és a lizoszómák egyidejű vizsgálata

A mikroszkópos tárgylemezre letapadt sejteket 1 μM [D-Lys⁶(FITC)]-GnRH-I konjugátummal, 8 órán keresztül inkubáltam, 5% CO₂ atmoszféra alatt, 37°C-on. Ezt követően eltávolítottam a kezelőszeres médiumot és kezelőszer-mentes médiummal további 2 óráig inkubáltam a sejteket. A médiumot 100 nM LysoTracker™ Red DND-99 (Thermo Fisher Scientific, katalógusszám: L7528) tartalmú médiumra cseréltem, majd 30 percen keresztül inkubáltam a sejteket. A médiumot kezelőszer-mentes médiumra cseréltem, egy további 30 perc inkubáltam a sejteket. PBS-el mostam a sejteket, majd 4% paraformaldehid metanolos oldatával 10 percig fixáltam szobahőmérsékleten. PBS mosás után 5 μM Draq5™ sejtmagfestéssel, 10 percig, szobahőmérsékleten inkubáltam a sejteket. Kétszer mostam PBS-el, végül pár csepp mounting médiumot adtam a sejtekhez.

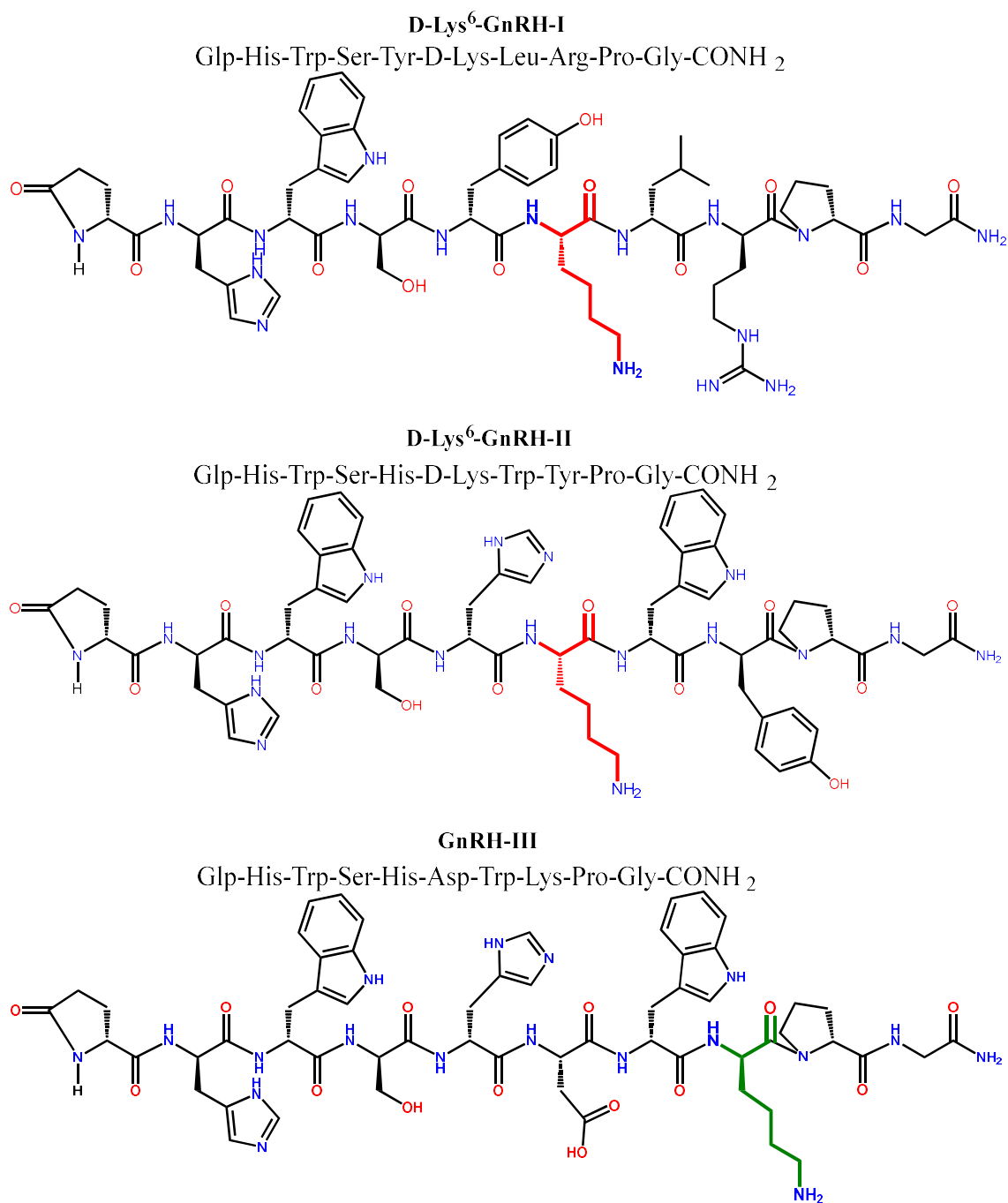
4.11 Áramlási citométer

A sejteket 12 lyukú lemezre raktuk ki, $4 \cdot 10^4$ sejt/lyuk mennyiségben. A sejteket teljes médiumban, 5% CO₂ atmoszféra alatt, 37°C-on, 48 óráig inkubáltam. A letapadt sejteket 1 μM , vagy 10 μM -koncentrációban alkalmazott FITC-GnRH konjugátumokkal, 1 órán, vagy 5 órán keresztül inkubáltam, 5% CO₂ atmoszféra alatt, 37°C-on. A kezelés után PBS-el kétszer mostam a sejteket, majd tripszin-EDTA elegyével (Lonza, katalógusszám: BE17-161E) 37°C-on inkubáltam a sejteket, amíg azok fel nem úsztak. Sejtenyészítő médium hozzáadását követően a sejteket FACS csövekbe pipettáztam át. A csöveket centrifugáltam (4°C, 4 perc, 150 g). A felülúszót dekantáltam, majd 5°C PBS hozzáadása után a sejteket óvatosan felszuszpendáltam és a csöveket a mérés befejeztéig jégre helyeztem. A sejtek fluoreszcencia-intenzitását áramlási citométerrel (BD FACSCalibur™) mértem. A FITC-GnRH konjugátumok gerjesztése 488 nm lézerrel, a detektálás az FL1 detektorral történt. Az adatok kiértékeléshez CellQuest Pro szoftvert (BD Biosciences) és Excel szoftvert (Microsoft Office Pro 2013) használtam.

5. Eredmények

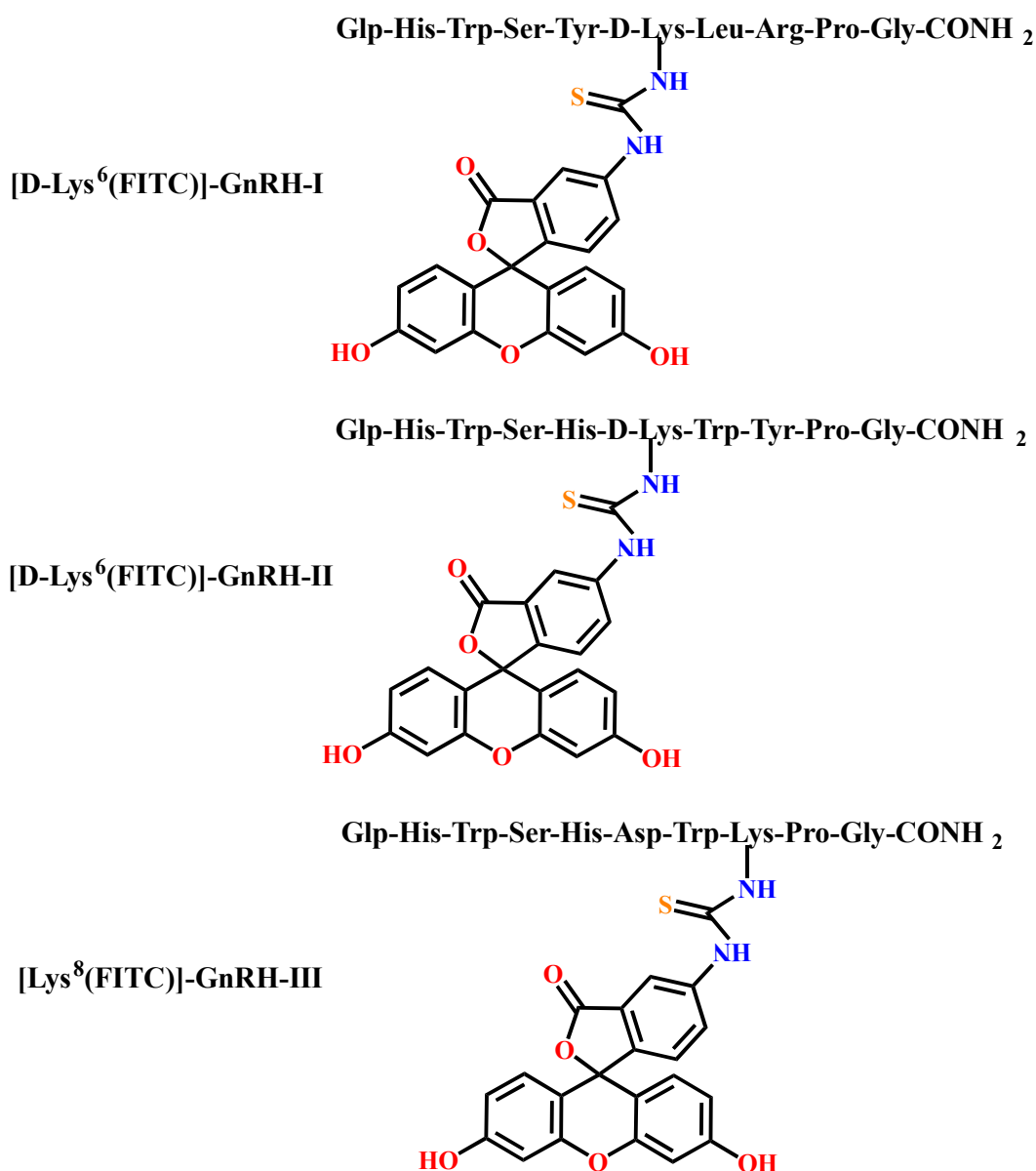
5.1 FITC-GnRH konjugátumok előállítása és fizikai-kémiai karakterizálása

PhD kutatómunkám során első célom FITC-jelölt GnRH analógok előállítása és vizsgálata volt. Szilárdfázisú peptidszintézissel állítottam elő a hatóanyag-szállítóként alkalmazható D-Lys⁶-GnRH-I, D-Lys⁶-GnRH-II és GnRH-III analógokat (10. ábra).



10. ábra: A D-Lys⁶-GnRH-I, D-Lys⁶-GnRH-II és GnRH-III szerkezete. A hatóanyagok konjugálására alkalmas D-lizin piros, az L-lizin zöld színnel van jelölve.

A FITC-jelölt GnRH analógok előállítása során, a védett peptidlánc felépítését követően, szelektíven eltávolítottam a Lys, illetve D-Lys oldalláncáról a védőcsoportot. A szabaddá vált ϵ -aminocsoporthoz ekvimoláris mennyiségű FITC-et kapcsoltam, amely stabil tiokarbamid kötést létesít. Az előállított [D-Lys⁶(FITC)]-GnRH-I, [D-Lys⁶(FITC)]-GnRH-II, [Lys⁸(FITC)]-GnRH-III szerkezete a 11. ábrán látható. A kromatográfiás és tömegspektrometriás adatokat a III. táblázat tartalmazza. A HPLC és MS felvételeket a melléklet tartalmazza.



11. ábra: Az előállított [D-Lys⁶(FITC)]-GnRH-I, [D-Lys⁶(FITC)]-GnRH-II, [Lys⁸(FITC)]-GnRH-III szerkezete.

III. táblázat: A FITC-GnRH konjugátumok kromatográfiás és tömegspektrometriás adatai.

vegyület	HPLC-UV ^a			ESI-MS ^b
	t _R (perc)	[M+3H] ³⁺ számít	[M+3H] ³⁺ mér	MW átlagos
[D-Lys ⁶ (FITC)]-GnRH-I	9,83	548,23	548,23	1641,68
[D-Lys ⁶ (FITC)]-GnRH-II	10,12	566,21	566,21	1695,64
[Lys ⁸ (FITC)]-GnRH-III	9,52	550,20	550,20	1647,60

^a HPLC III. módszer, detektálás: $\lambda = 220$ nm
^b Molekulatömeg meghatározás tömegspektrométerrel

5.1.1 Oldhatóság és stabilitás

A FITC-GnRH konjugátumok oldhatóságát PBS-ben mértem. Az eredményeket a IV. számú táblázat tartalmazza. Az oldhatóság csökkenését a FITC-jelölés következtében a GnRH-I és GnRH-II esetén tapasztaltam. A stabilitást 10% FBS-t tartalmazó RPMI médiumban, 37°C-on, 24 órás inkubálást követően vizsgáltam. A HPLC-UV analízis alapján mind a három konjugátum stabilis, bomlástermékek nem detektálhatók.

IV. táblázat: A FITC-jelölt és a jelöletlen GnRH analógok kinetikai oldhatósága.

vegyület	oldhatóság (μ M)*
D-Lys ⁶ -GnRH-I	> 200
[D-Lys ⁶ (FITC)]-GnRH-I	94 \pm 7
D-Lys ⁶ -GnRH-II	> 200
[D-Lys ⁶ (FITC)]-GnRH-II	48 \pm 3
GnRH-III	> 200
[Lys ⁸ (FITC)]-GnRH-III	> 200

*PBS; pH= 7,4; 25°C; a mérési tartomány felső határa: 200 μ M; SD; N=3

5.1.2 Permeabilitás

A GnRH-R közvetített, szelektív transzport feltétele, hogy a GnRH konjugátumok passzív membrántranszporttal ne jussanak be a sejtekbe. A FITC-GnRH konjugátumok permeabilitását mesterséges membránon (PAMPA), illetve MDCK sejtekből növesztett sejtrétegen vizsgáltam. A PAMPA mérés adatait az V. táblázat tartalmazza. A konjugátumok nem jutottak át a mesterséges membránon, tehát passzív membrántranszportra nem képesek. A kontrollként alkalmazott fluorescein nagyon alacsony, a koffein pedig közepes permeabilitást mutatott. Az UV-látható abszorbancia spektrumokat a melléklet tartalmazza. Az MDCK sejteken mért permeabilitás

megerősítette a PAMPA vizsgálat során kapott eredményeket. Az apikális-bazális, illetve a bazális-apikális irányú transzportot vizsgálva, a donor lyukakban sem szabad fluoreszceint, sem pedig FITC-GnRH konjugátumokat nem találtam kimutatható mennyiségben. A pozitív kontroll koffein permeabilitása jól mérhető volt. Az MDCK mérés során felvett HPLC-UV kromatogramok a mellékletben láthatóak.

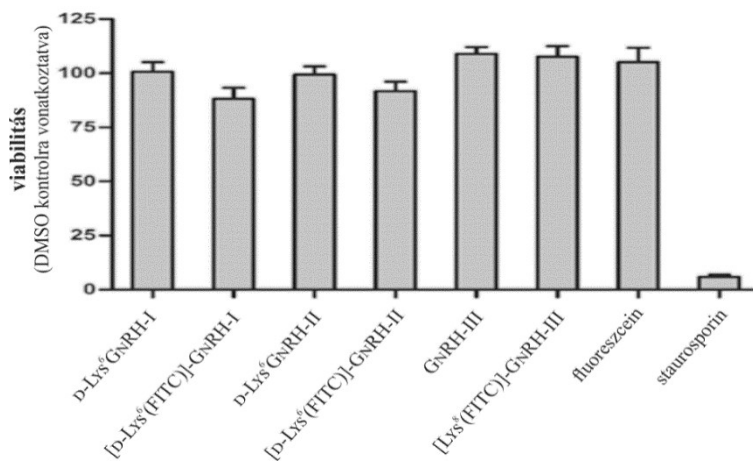
V. táblázat: A FITC-GnRH konjugátumok, a fluoreszcein és a koffein permeabilitása PBS-ben (pH=7,4), mesterséges membránon (PAMPA módszer). SD; N=2

vegyület	Pe (10^{-6} cm/s) *	R (%) **
[D-Lys ⁶ (FITC)]-GnRH-I	~0,0	23,7
[D-Lys ⁶ (FITC)]-GnRH-II	~0,0	35,1
[Lys ⁸ (FITC)]-GnRH-III	~0,0	14,5
fluoreszcein	0,2 ±0,1	7,8
koffein	11,8 ±0,9	~0,0

*Pe: effektív permeabilitási együttható (10^{-6} cm/s); N=2
 **R: tömeg retenció

5.1.3 Citotoxicitás

A FITC-GnRH konjugátumokkal kapcsolatos elvárásom volt, hogy minél kevésbé legyenek sejtoxikusak. Ez lehetővé teszi, hogy a sejtek életképességét és a GnRH-R által felvehető GnRH analógok mennyiségét kevésbé befolyásoljuk. A jelölt és jelöletlen GnRH analógok toxicitását NIH/3T3 egér fibroblaszt sejteken, MTT módszerrel hasonlítottuk össze. 40 μ M koncentrációban, 24 óráig inkubálva a sejteket, egyik konjugátum esetében sem tapasztaltuk a sejtek életképességének jelentős csökkenését. Negatív kontrollnak fluoreszceint, pozitív kontrollnak staurosporint alkalmaztam. A kapott eredményeket a 12. ábra tartalmazza.



12. ábra: A jelölt és jelöletlen GnRH analógok hatása (40 μ M, 24 óra) az NIH/3T3 egér fibroblaszt sejtek életképességére (MTT teszt). SD; N=3

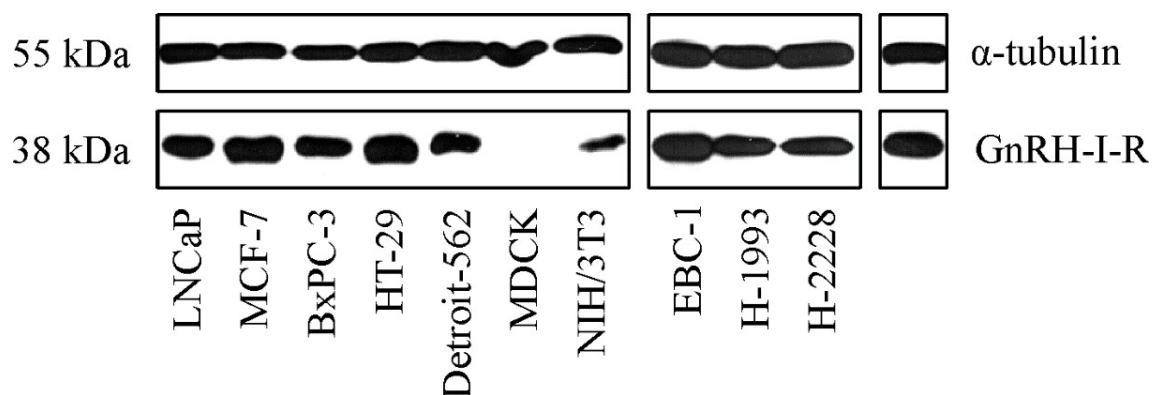
5.2 FITC-GnRH konjugátumok vizsgálata daganatsejteken

5.2.1 GnRH-R expresszió

A FITC-GnRH konjugátumok vizsgálatára négy, a szakirodalomban gyakran publikált, ismert GnRH-I-R expresszáló sejtvonal mellett, további hat olyan sejtvonalat választottam ki, melyek GnRH-I-R expressziójáról nem találtam irodalmi adatot. A sejtvonalak GnRH-I-R expresszióját humán GnRH-I receptor specifikus antitesttel, western blot módszerrel vizsgáltuk. Az eredményeket a VI. számú táblázat és a 13. ábra foglalja össze.

VI. táblázat: GnRH-I-R expresszió vizsgálata több sejtvonalon.

sejtvonal	szöveti eredet	GnRH-I-R expresszió szakirodalom	GnRH-I-R expresszió mért*
LNCaP	prosztatarák	igen	igen
MCF-7	mellrák	igen	igen
BxPC-3	hasnyálmirigy-rák	igen	igen
HT-29	vastagbélrák	igen	igen
Detroit-562	garatrák	nem ismert	igen
EBC-1	tüdőrák	nem ismert	igen
H-1993	tüdőrák	nem ismert	igen
H-2228	tüdőrák	nem ismert	igen
MDCK	kutya vese epitél	nem ismert	nem
NIH/3T3	egér fibroblaszt	nem ismert	igen
*: humán GnRH-I-R antitest			



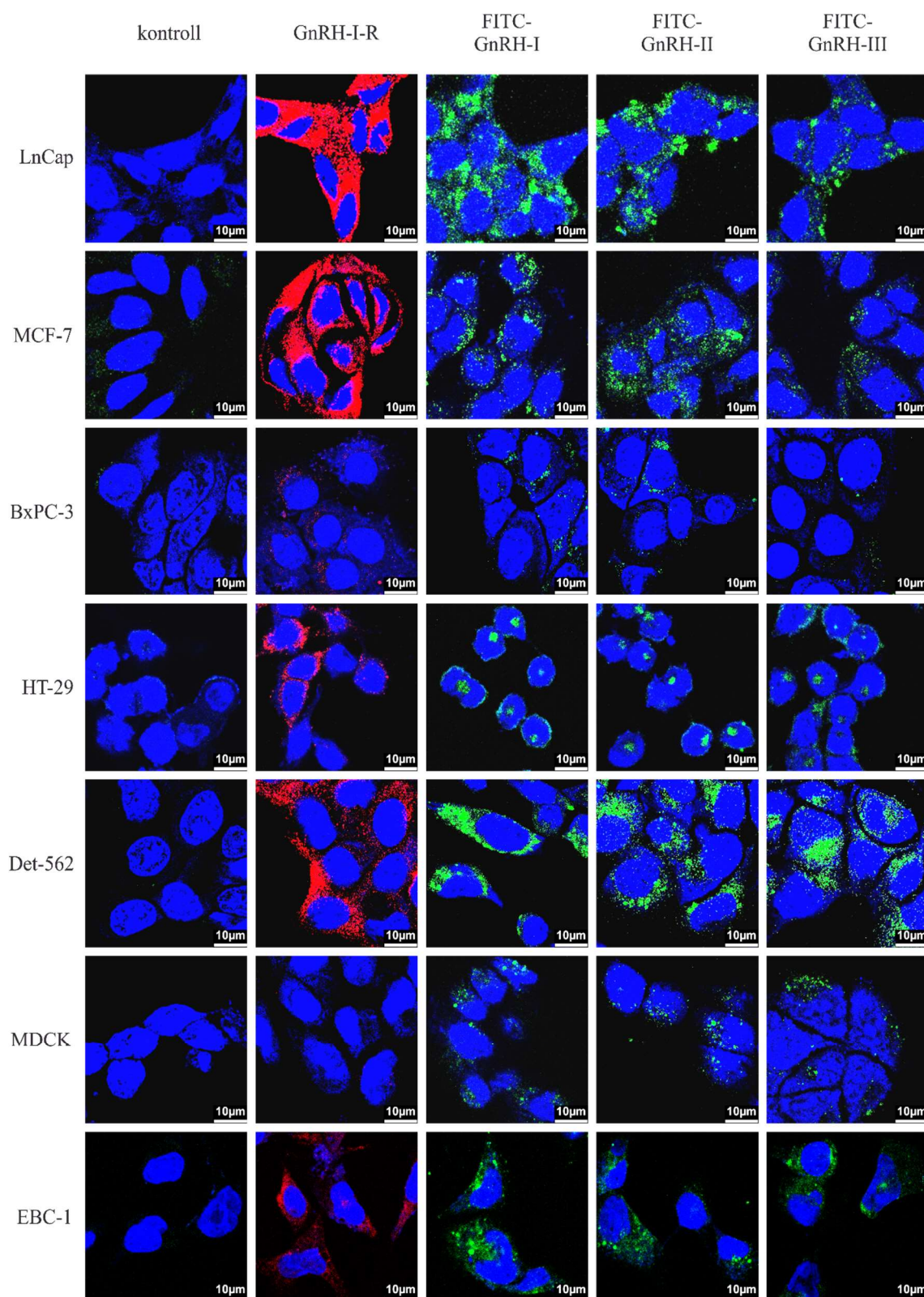
13. ábra: Totál GnRH-I-R fehérje kimutatása sejtlizátumokból western blot módszerrel.

Általánosságban elmondható, hogy a GnRH-I-R fehérje jelenléte mindegyik vizsgált daganat-sejtvonal esetében kimutatható volt. A fehérjét az NIH/3T3 egér fibroblaszt sejtek is expresszálják, egyedül MDCK kutya vese sejtvonalon adott negatív eredményt a hGnRH-I-R antitest.

5.2.2 Összefüggés a membrán GnRH-I-R és a FITC-GnRH mennyisége között

Konfokális lézer pásztázó mikroszkóppal detektáltam az immuncitokémiai módszerrel jelölt sejtfelszíni GnRH-I receptorokat permeabilizálatlan sejteken. A 14. ábrán látható, hogy a különféle sejtvonalak eltérő mennyiségben tartalmazzák a GnRH-I-R fehérjét a membránjukban. Az LNCaP és az MCF-7 sejtek fokozottabb, a HT-29, Detroit-562 és EBC-1 sejtek pedig mérsékeltabb sejtfelszíni receptor expressziót mutatnak. A BxPC-3 esetében a GnRH-I-R alig detektálható, az MDCK sejtek felszínén pedig a hGnRH-I-R antitest nem talált receptort.

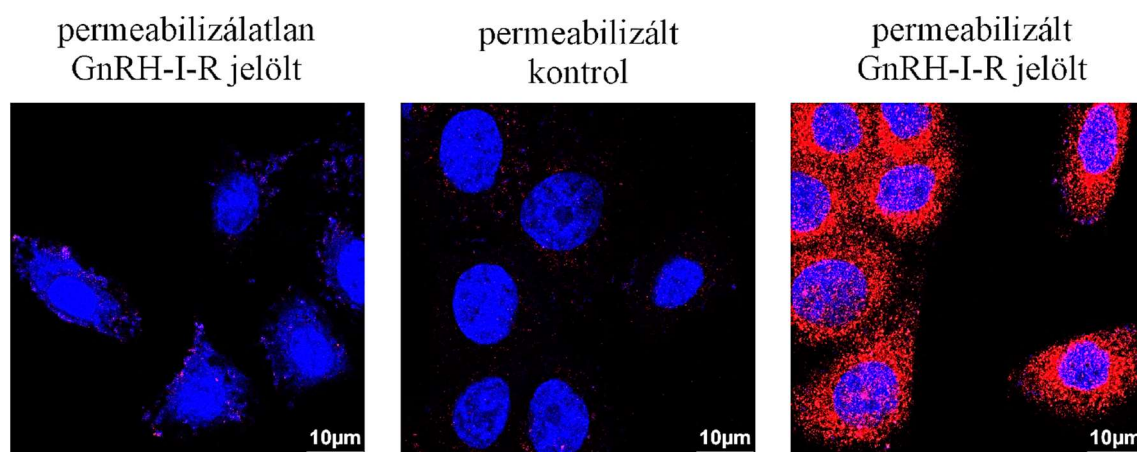
A sejteket FITC-GnRH analógokkal, illetve szabad fluoreszcinnel 10 μ M koncentrációban, 5 órán keresztül inkubáltam. A konfokális pásztázó mikroszkóppal készített felvételek a 15. ábrán láthatók. A negatív kontrollként alkalmazott fluoreszcein gyakorlatilag nem detektálható a sejtekben. A FITC-GnRH konjugátumokat mindegyik sejtvonal tartalmazza, eltérő mennyiségben. A legnagyobb mennyiség az LNCaP és Detroit-562 sejtekben látható, valamivel kevesebb az MCF-7 és EBC-1 sejtekben. Kisebb mennyiség látható a HT-29 és MDCK sejtekben, és a mind a három konjugátum csak nyomokban detektálható a BxPC-3 sejtekben. Megállapítható, hogy az MDCK sejtek kivételével, a sejtek által felvett konjugátumok mennyisége korrelál a sejtfelszínen expresszált GnRH-I-R mennyiségével.



14. ábra: CLSM felvételek az immuncitokémiai módszerrel jelölt, 10 μ M fluoreszceinnel, illetve 10 μ M D-Lys⁶(FITC)]-GnRH-I, [D-Lys⁶(FITC)]-GnRH-II és [Lys⁸(FITC)]-GnRH-III konjugátumokkal 5 óráig kezelt sejtekről. Kék szín: sejtmag; piros szín: GnRH-I-R; zöld szín: FITC-GnRH konjugátumok.

5.2.3 A sejtfelszíni GnRH-I-R hiánya BxPC-3 sejteken

Érdekes eredmény, hogy bár a western blot igazolta a GnRH-I-R expresszióját a BxPC-3 sejtekben, azonban a sejtfelszíni jelölést követően a GnRH-I-R csak nyomokban detektálható. Ezért a BxPC-3 sejteket permeabilizáltam és immuncitokémiai módszerrel újból megvizsgáltam őket. A 15. ábra igazolja, hogy a GnRH-I-R nagy mennyiségben expresszálódik a BxPC-3 sejtekben, azonban esetükben a receptor nem helyeződik ki a membránba. Megfigyelhető az is, hogy a permeabilizálatlan sejtek esetén a DRAQ-5 sejtmagfesték kisebb hatékonysággal képes a sejtmag festésére, ezért a megfelelő intenzitású jel érdekében alkalmazott nagyobb detektorérzékenység mellett a festék a sejtplazmában is kimutatható. A DRAQ-5 jelenléte a sejtplazmában az összes permeabilizálatlan sejtről készített CLSM felvételen megfigyelhető.



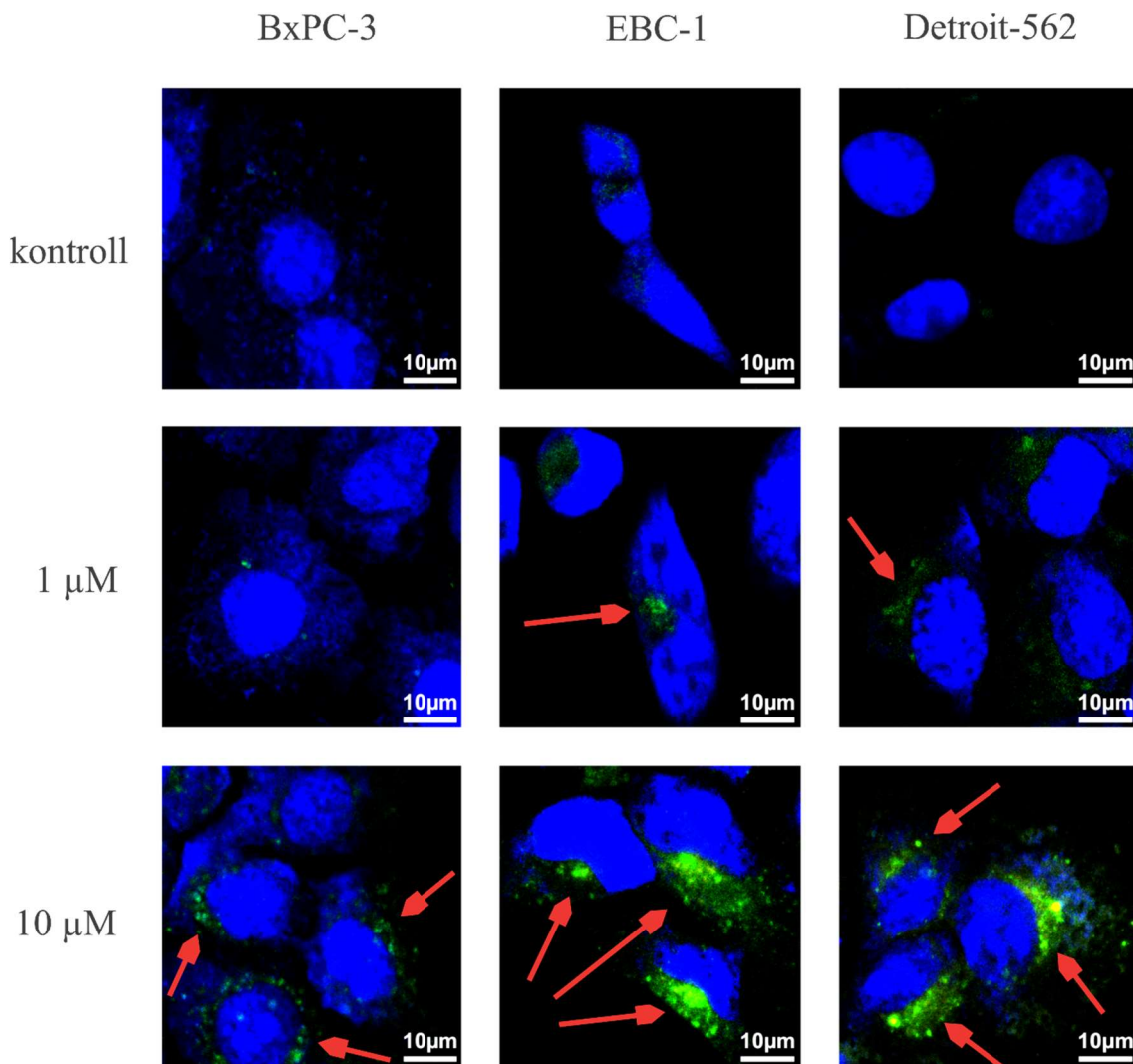
15. ábra: Mikroszkópos felvételek a permeabilizálatlan és permeabilizált BxPC-3 sejtekről. Kék szín: sejtmag, piros szín: GnRH-I-R.

5.2.4 FITC-GnRH konjugátumok koncentrációfüggő bejutása a sejtekbe

A korábbi eredmények alapján a FITC-GnRH konjugátumok koncentrációfüggő CLSM vizsgálatára a GnRH receptort a sejtmembránban nem tartalmazó BxPC-3 hasnyálmirigyrák, illetve az új terápiás célpontként azonosított Detroit-562 garatrák és EBC-1 tüdőrák sejtvonalakat választottam ki.

A BxPC-3, EBC-1 és Detroit-562 sejteket 1 μ M, illetve 10 μ M FITC-GnRH-I konjugátummal 5 órán keresztül kezeltem, kontrollnak 10 μ M szabad fluoreszcint alkalmaztam. A 16. ábra CLSM felvételein látszik, hogy a sejtekbe jutott konjugátum mennyisége koncentrációfüggést mutat. A 10 μ M-os kezelésekhez képest 1 μ M esetén az EBC-1 és Detroit-562 sejtek kisebb, de még detektálható mennyiségben tartalmazzák a

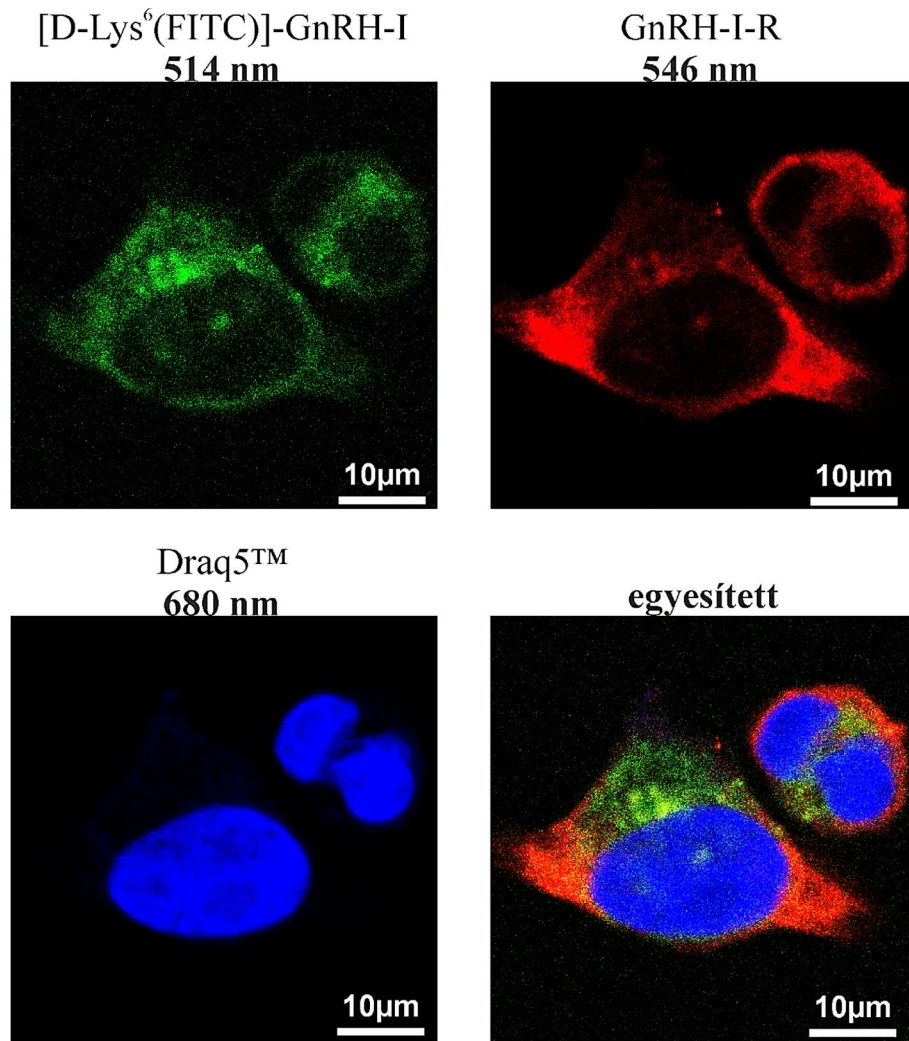
konjugátumot (piros nyíllal jelölve). A BxPC-3 sejtekben 1 μM esetén még nincs szignifikáns fluoreszcencia intenzitás növekedés a kontroll sejtekhez viszonyítva.



16. ábra: A 10 μM szabad fluoreszceinnel (kontroll) és az 1 μM és a 10 μM [D-Lys⁶(FITC)]-GnRH-I konjugátummal 5 órán keresztül kezelt BxPC-3, EBC-1 és Detroit-562 sejtek CLSM felvételei. Kék szín: sejtmag, zöld szín: fluoreszcein, vagy [D-Lys⁶(FITC)]-GnRH-I

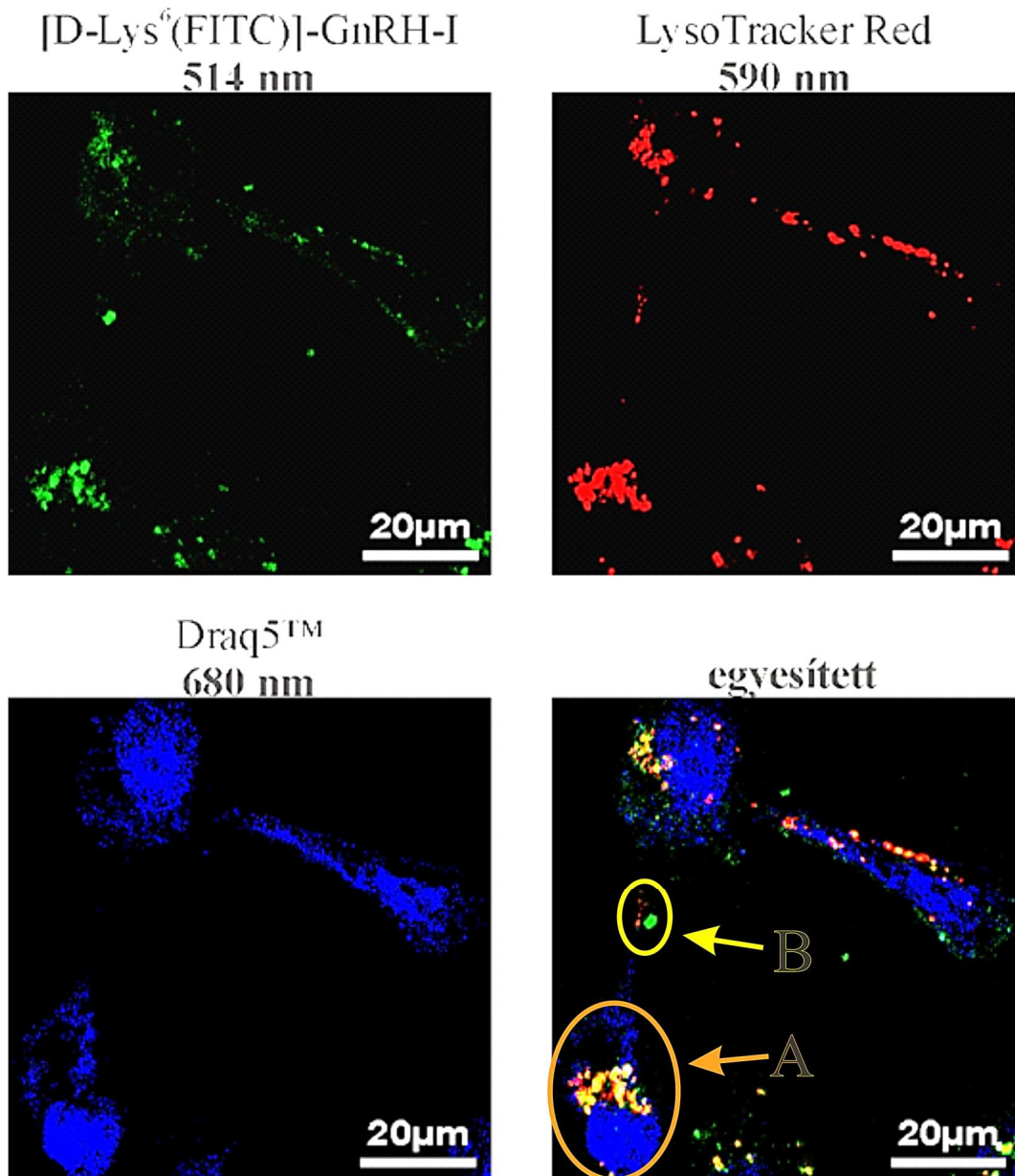
5.2.5 FITC-GnRH konjugátumok lokalizációja

Az EBC-1 sejteket 10 μM FITC-GnRH-I konjugátummal 1 órán keresztül kezeltem, majd a kezelés lejárta után 1 órával immuncitokémiai módszerrel jelöltem a GnRH-I receptorokat. A 17. ábrán látható CLSM felvétel bizonyítja, hogy a konjugátum és a sejtfelszíni receptorok lokalizációja eltér. A konjugátum aktív transzportját igazolja, hogy legnagyobb mennyiségben a sejtek membránján belül detektálható.



17. ábra: Az EBC-1 sejtek membránján expresszáldó GNRH-I receptorok és a [D-Lys⁶(FITC)]-GnRH-I (10 μM, 1 óra) lokalizációja. Kék szín: sejtmag; zöld szín: [D-Lys⁶(FITC)]-GnRH-I; piros szín: GnRH-I-R

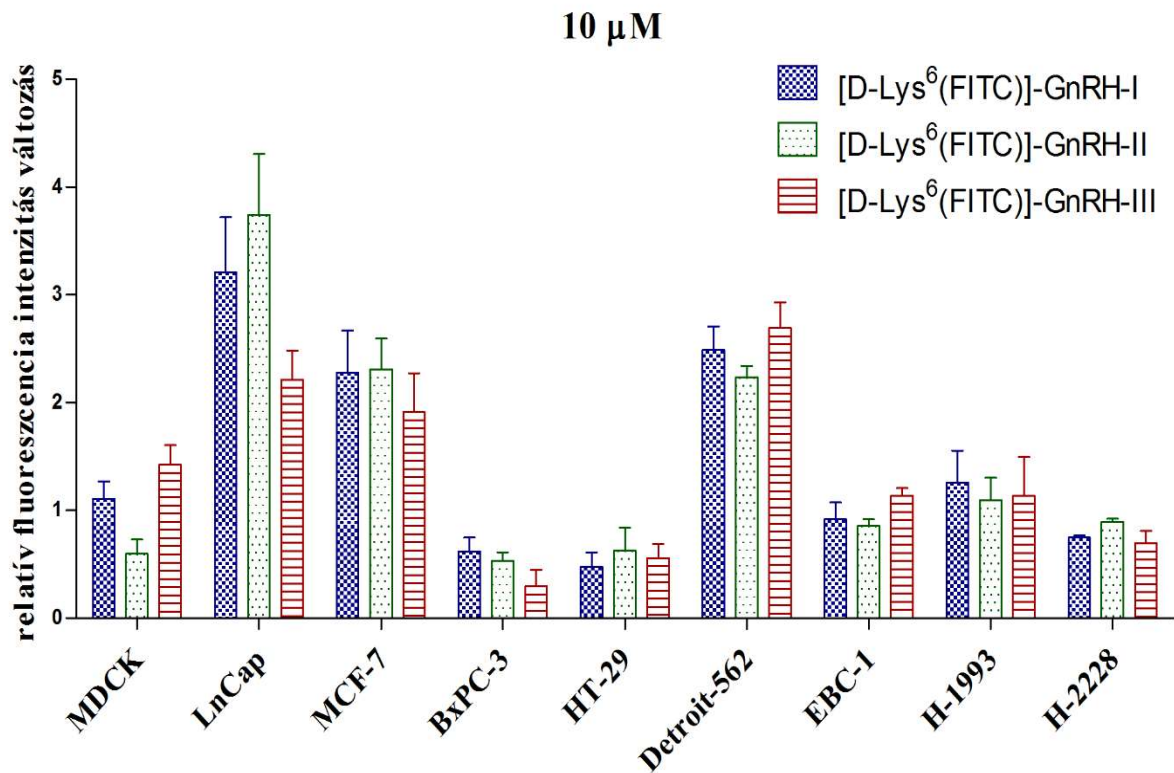
Következő kísérletem során 1 μM FITC-GnRH-I konjugátummal 8 órán keresztül kezeltem az EBC-1 sejteket. A kezelőszer eltávolítása után még 3 órán keresztül inkubáltam a sejteket, mialatt a lizoszómákat megfestettem. Az ezt követően elkészített, 18. ábrán látható CLSM felvétel igazolja, hogy a konjugátum által emittált fluoreszcens jel többnyire a lizoszómákban koncentrálódik („A” nyíl). A FITC-GnRH-I konjugátum és a LysoTracker Red lizoszóma festék által emittált fény spektruma azonban egymástól jól elkülöníthető („B” nyíl).



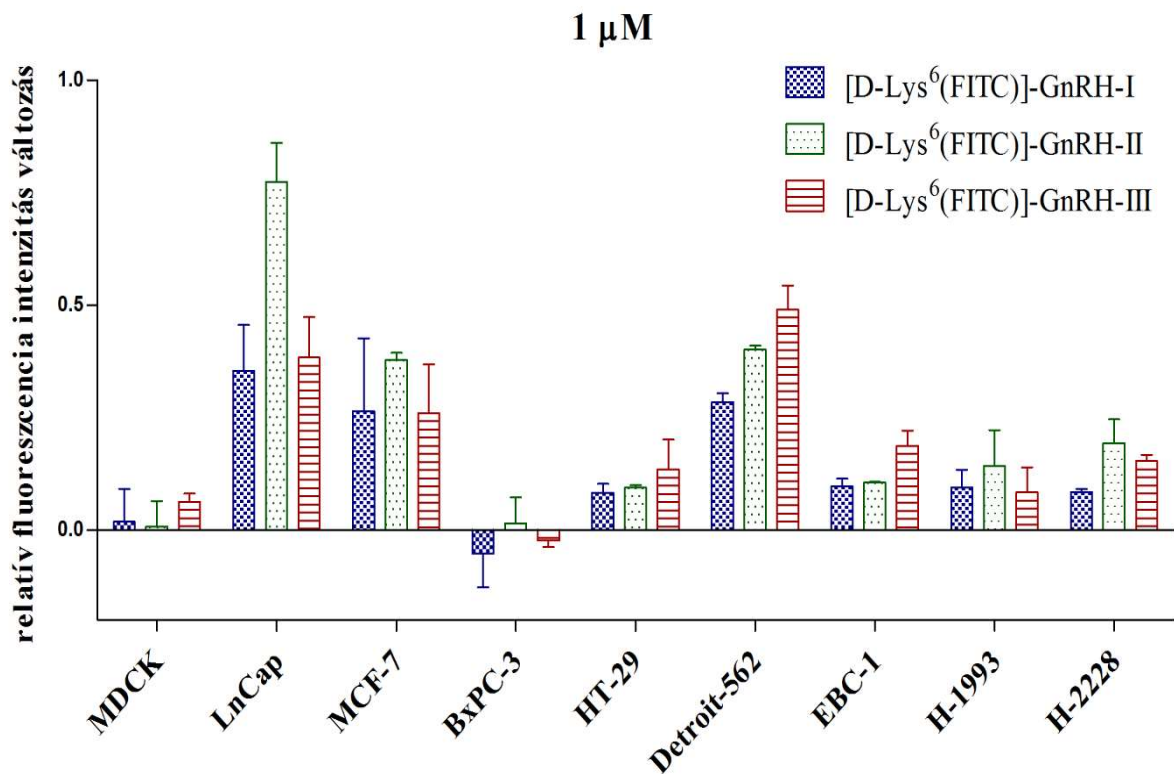
18. ábra: Az EBC-1 sejtek lizoszómái és a $[D-Lys^6(FITC)]-GnRH-I$ ($1 \mu M$, 8 óra) lokalizációja. Kék szín: sejtmag; zöld szín: a $[D-Lys^6(FITC)]-GnRH-I$; piros szín: lizoszóma. A nyíl: A $[D-Lys^6(FITC)]-GnRH-I$ többnyire a lizoszómákban koncentrálódik. B nyíl: Az eltérő lokalizációjú jelek esetén látható, hogy az FITC (detektálás: 489-526 nm) és a Lysotracker festék (detektálás: 583-631 nm) által emittált fény spektruma egymástól elkülöníthető.

5.2.6 FITC-GnRH mennyiségének kvantitatív vizsgálata

A sejtek által felvett FITC-GnRH konjugátumok mennyiségét kvantitatív módon, áramlási citométerrel mértem meg. Az 1 órás és az 5 órás kezelések után mért relatív fluoreszcencia intenzitás értékek különbségét kiszámítottam, az így kapott fluoreszcencia intenzitás növekedés mértékét a 19. és a 20. ábrák mutatják be. A számítási képletet a melléklet tartalmazza.



19. ábra: A 10 μ M FITC-GnRH konjugátumokkal kezelt sejtek relatív fluoreszcencia intenzitásának változása az 1 és az 5 órás kezelések között. SD; N=3



20. ábra: Az 1 μ M FITC-GnRH konjugátumokkal kezelt sejtek relatív fluoreszcencia intenzitásának változása az 1 és az 5 órás kezelések között. SD; N=3

10 μM esetén (19. ábra), az összes sejtvonalban kimutathatók a FITC-GnRH konjugátumok, a CLSM méréssel (14. ábra) összhangban. A konjugátumokat leghatékonyabban az LNCaP, MCF-7 és Detroit-562 sejtek veszik fel. Az EBC-1, H-1993, H-2228 tüdőrák sejtek esetében közepes mennyiség tapasztalható. A legkevesebb konjugátum a BxPC-3 és a HT-29 sejtekben mérhető. A sejtvonalak közötti eltérésekhez viszonyítva a három konjugátum bejutási hatékonysága között nincsen jelentős különbség.

1 μM kezelőszó koncentráció esetén (20. ábra) mind a sejtvonalak, mind pedig a konjugátumok közötti különbségek jobban kivehetőek. A GnRH analógok jó célpontjaként ismert LNCaP, MCF-7 és HT-29 sejtekhez viszonyítva az újonnan vizsgált Detroit-562 garatrák, illetve az EBC-1, H-1993 és H-2228 tüdőrák sejtek esetén is egyértelmű, hogy a konjugátumok jelentős mennyiségben dúsulnak a sejtekben.

Az 1 μM FITC-GnRH-val kezelt sejtek relatív fluoreszcencia intenzitását a VII. táblázat foglalja össze. Az 5 órás kezelés után a GnRH-I és GnRH-III konjugátumok legnagyobb mennyiségét a Detroit-562 garatrák sejtek tartalmazzák. A GnRH-II esetében az LNCaP prosztatarák sejtek bizonyultak a legjobb célpontnak. Az EBC-1, H-1993 és H-2228 tüdőrák sejtekben mérhető fluoreszcencia intenzitás mind a három konjugátum esetén jelentős. Összességében elmondható, hogy a humán GnRH-I-R-t nem expresszáló MDCK kutya vese epitél sejtek, illetve a receptort a sejt felszínen nem tartalmazó BxPC-3 hasnyálmirigysejtekhez képest a többi GnRH-R expresszáló daganatsejt szignifikánsan több konjugátumot tartalmaz.

VII. táblázat: Az 1 μM FITC-GnRH konjugátumokkal kezelt sejtek relatív fluoreszcencia intenzitása egy, illetve öt órás kezelést követően. SD; N=3

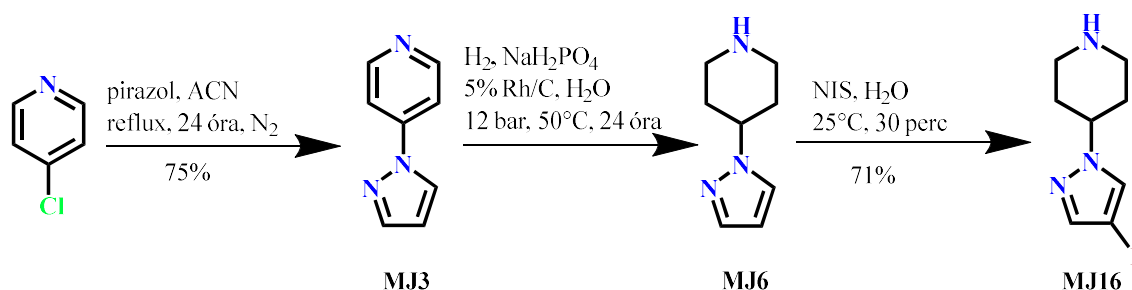
sejtvonal	[D-Lys ⁶ (FITC)]- GnRH-I*		[D-Lys ⁶ (FITC)]- GnRH-II*		[Lys ⁸ (FITC)]- GnRH-III*	
	1 óra	5 óra	1 óra	5 óra	1 óra	5 óra
MDCK	0,08±0,06	0,11±0,02	0,04±0,06	0,05±0,01	0,09±0,03	0,15±0,02
LNCaP	0,20±0,05	0,56±0,10	0,34±0,03	1,11±0,05	0,16±0,02	0,54±0,08
MCF-7	0,31±0,10	0,57±0,08	0,35±0,13	0,73±0,14	0,24±0,08	0,50±0,07
BxPC-3	0,14±0,09	0,09±0,05	0,05±0,05	0,07±0,01	0,03±0,04	0,01±0,02
HT-29	0,10±0,05	0,19±0,07	0,12±0,06	0,21±0,05	0,17±0,02	0,30±0,07
Detroit-562	0,32±0,02	0,61±0,03	0,27±0,04	0,67±0,03	0,33±0,05	0,82±0,08
EBC-1	0,18±0,07	0,27±0,05	0,18±0,04	0,29±0,04	0,22±0,04	0,41±0,01
H-1993	0,22±0,07	0,31±0,08	0,22±0,10	0,36±0,10	0,23±0,07	0,31±0,07
H-2228	0,22±0,01	0,30±0,02	0,21±0,02	0,40±0,03	0,11±0,03	0,26±0,02

5.3 Crizotinib totálszintézise

A FITC-GnRH analógok után PhD kutatómunkám további célja a crizotinib előállítása, GnRH-val történő konjugálása és a konjugált crizotinib vizsgálata volt. Ennek megvalósítása érdekében irodalmi forrásokra alapozva reprodukáltam a crizotinib totálszintézisét, majd a konjugálás feltételeihez igazodva a totálszintézis egyes lépéseit átdolgoztam.

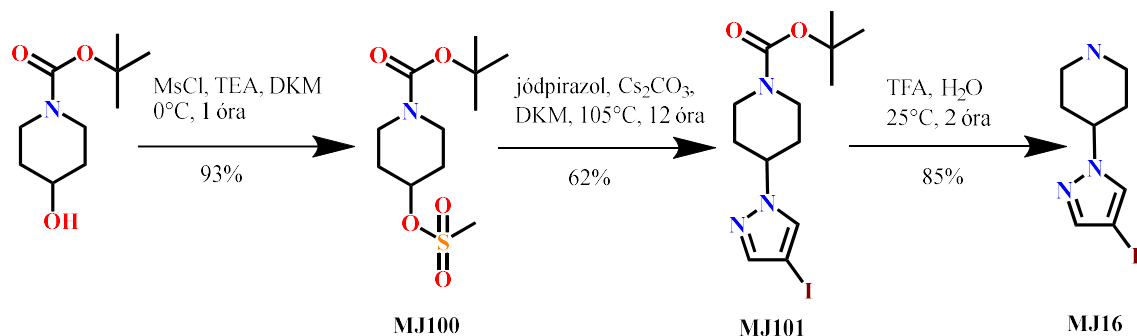
A [D-Lys⁶(crizotinib)]-GnRH-I konjugátum megtervezése során a crizotinib c-Met és ALK fehérjékkel alkotott komplexének egyedi szerkezetét vettem alapul (21. oldal, 5. ábra). A fehérje-kötőzsebből kifelé álló piperidin gyűrű bázikus aminos csoportja alkalmas funkciós csoportnak bizonyult a konjugálására. A szelektív konjugálása érdekében azonban a 2-aminopiridin aromás aminos csoportját ideiglenesen védenem kellett.

A crizotinib szintézis egyik kulcsintermedierje a 4-(4-Jód-1H-pirazol-1-il)-piperidin (MJ16). Előállítását két alternatív reakcióút szerint valósítottam meg. A 21. ábrán látható eljárás során 4-klórpipridinből indultam ki, amit pirazollal reagáltattam. A második lépésben a piridin gyűrűt ródium katalizált hidrogénezéssel szelektíven redukáltam piperidinné. A harmadik lépés a pirazol gyűrűn történő szubsztitúció volt jóddal, amihez N-jód-szukcinimidet (NIS) alkalmaztam.



21. ábra: 4-(4-Jód-1H-pirazol-1-il)-piperidin (MJ16) előállítása: 1. alternatíva.

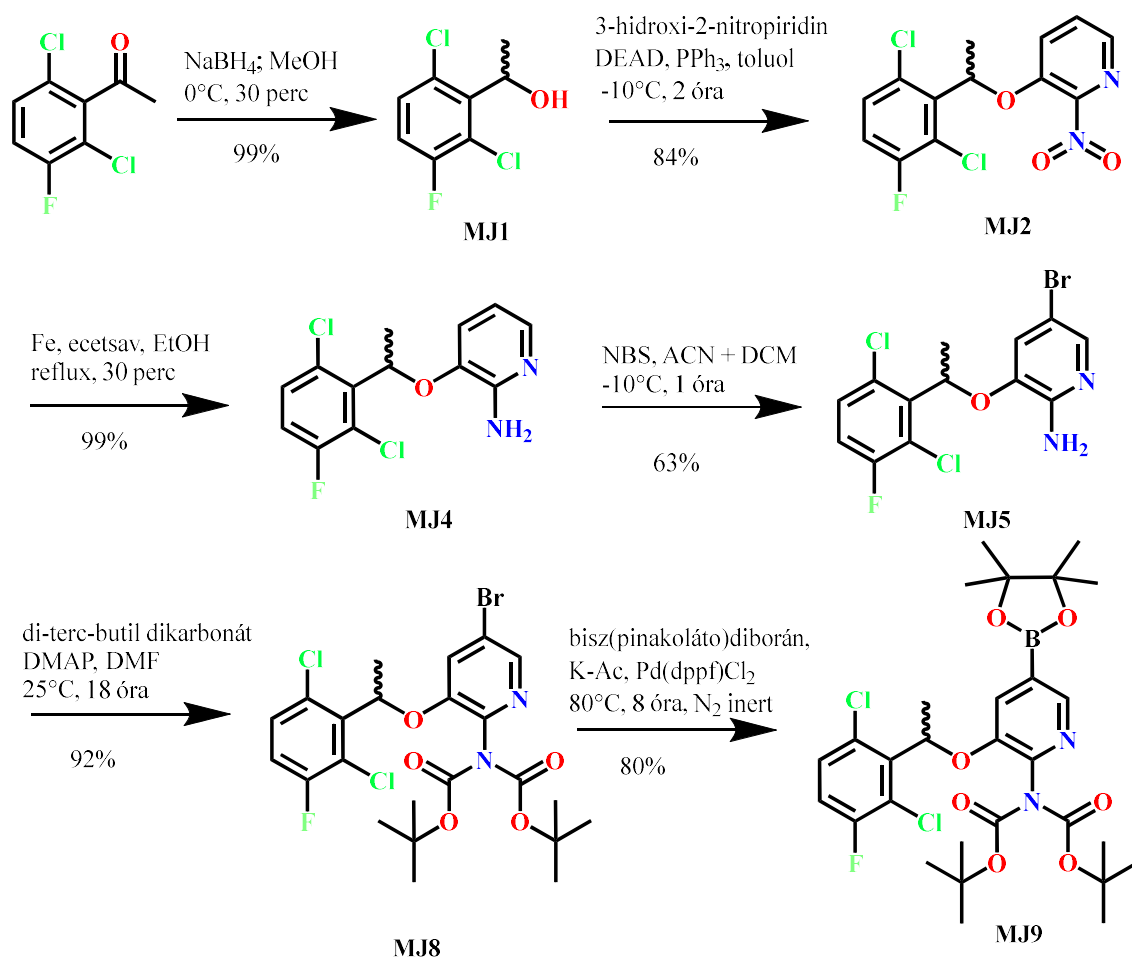
A 22. ábrán látható eljárás esetében Boc védett 4-hidroxipiperidinből indultam ki, amit mezil-kloriddal (MsCl) reagáltattam. A terméket a második lépésben jódpirazollal reagáltattam. A harmadik lépésben eltávolítottam a Boc védőcsoportot. A két alternatív reakcióutat összeségében hasonló kitermeléssel valósítottam meg. Környezetvédelmi szempontból az első eljárás a kedvezőbb.



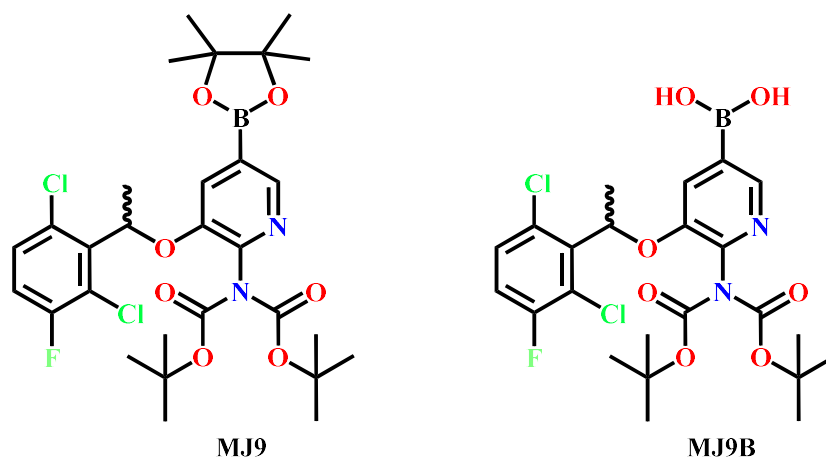
22. ábra: 4-(4-Jód-1H-pirazol-1-il)piperidin (MJ16) előállítása: 2. alternatíva.

A 23. ábrán látható reakcióút szerint kerül kialakításra a crizotinib célfehérje-kötődéséért felelős 2-aminopiridin alapváza. A szintézis első lépése 2,6-diklór-3-fluoracetofenonból indul ki, melynek redukciója nátrium-borohidriddel racém 1-(2,6-diklór-3-fluorfenil)-etanolt eredményez (MJ1). A második lépés során vagy az első lépésben előállított racém terméket, vagy a vásárolt enantiomer-tiszta (S)-1-(2,6-diklór-3-fluorfenil)-etanolt reagáltattam 3-hidroxi-2-nitropiridinnel. Ez az úgynevezett Mitsunobu-reakció a kiralitáscentrum inverziójával jár, így a racém alkohol racém terméket, az (S)-alkohol (R)-terméket eredményez (MJ2). A Mitsunobu-reakció során kialakított kiralitáscentrum a szintézis összes további lépése során változatlanul megmarad. A harmadik lépésben a nitrocsoportot redukáltam aminocsoporttá (MJ4), ami fokozva az aromás gyűrű nukleofilítást megkönnyíti és para helyzetbe irányítja a bróm szubsztitúcióját a negyedik lépésben (MJ5). Az ötödik lépésben az aminocsoportot Boc védőcsoportokkal láttam el (MJ6). A hatodik lépés során Pd(dppf)Cl_2 katalizált reakcióban a brómatom helyére boronsav-észter csoport kerül (MJ9).

A szakirodalom szerint, a boronsav-észtert a para helyzetben lévő elektronszívó csoportok (ilyen a Di-Boc védett aminocsoport is) destabilizálják, így az észter könnyebben hidrolizál boronsavvá [199]. Ezzel összefüggésben az LC-MS szerkezetazonosítás alapján (lásd a mellékletben) nekem is kizárólag a 24. ábrán látható boronsavat tartalmazó terméket (MJ9B) sikerült izolálnom. Ez azonban nem jelentett problémát, mert ez a funkciós csoport is alkalmas az ezt követő Suzuki–Miyaura keresztkapcsolásra.

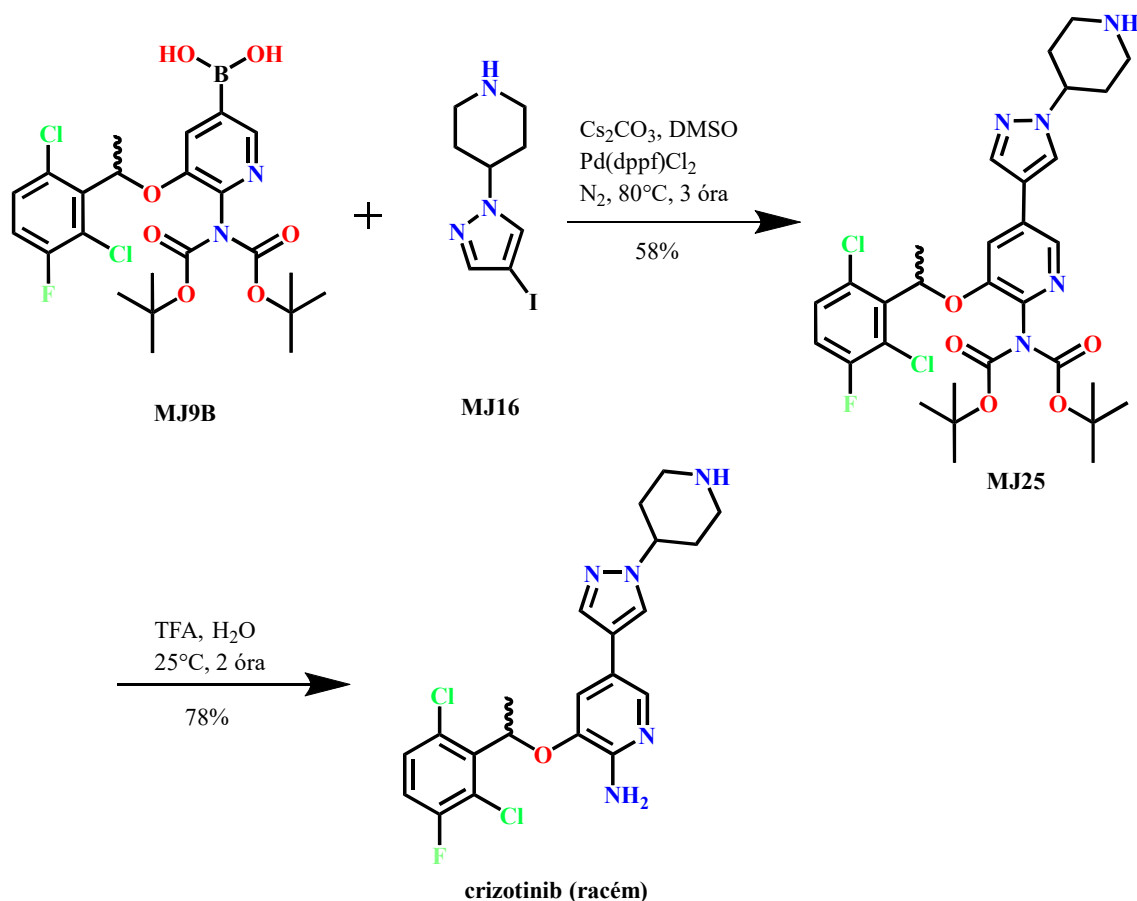


23. ábra: A crizotinib Boc-védett 2-aminopiridin alapvázának szintézise.



24. ábra: A boronsav-pinakol-észtert tartalmazó MJ9 hidrolízisével keletkező, boronsavat tartalmazó MJ9B szerkezete. Az MJ9B vegyület a crizotinib és analógjainak kulcsintermediere.

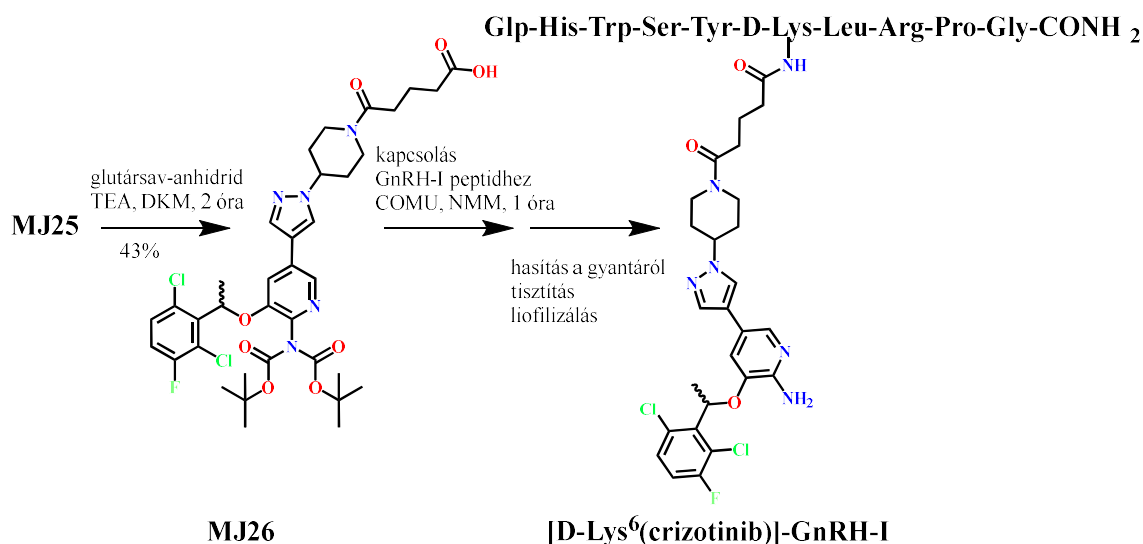
A crizotinib szintézis következő lépése a két kulcsintermediér, az MJ9B és az MJ16 Suzuki–Miyaura keresztkapcsolási reakciója, ami a 25. ábrán látható. A crizotinib totálszintézis utolsó lépésében eltávolítottam a Boc védőcsoportokat és a kiindulási anyagtól függően (23. ábra) kaptam meg a racém, vagy az (R)-crizotinibet.



25. ábra: A Suzuki–Miyaura keresztkapcsolás és a Boc védőcsoportok eltávolítása. A kapott termék a crizotinib.

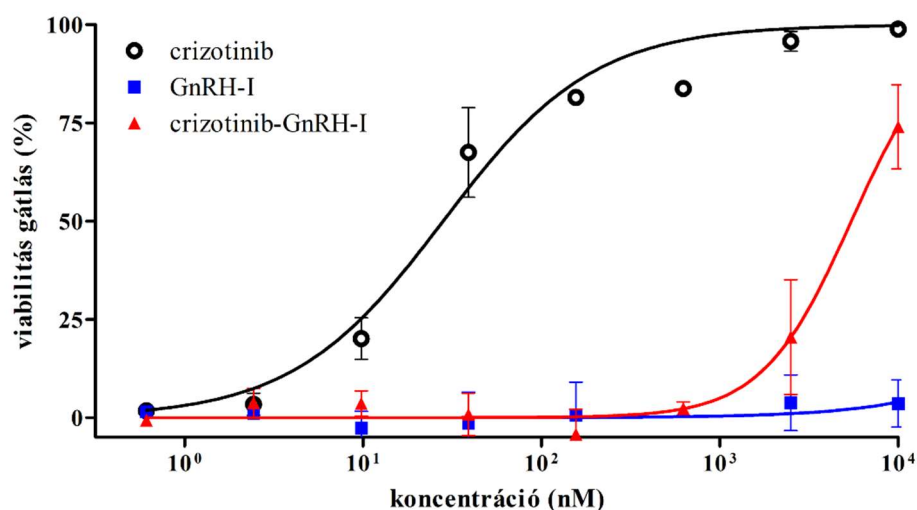
5.4 Crizotinib-GnRH-I konjugátum előállítása és vizsgálata

A [D-Lys⁶(crizotinib)]-GnRH-I konjugátum (továbbiakban: crizotinib-GnRH-I) esetében összekötő egységnek (linkernek) a szakirodalmban leírt GnRH konjugátumokban is gyakran alkalmazott glutársavat választottam. A konjugátum szintézise a 26. ábrán látható. A szelektíven Boc védett racém crizotinibből kiindulva (25. ábra, MJ25 vegyület), a glutársavanhidrid a crizotinib piperidin gyűrűjének nitrogénatomjával stabil savamid kötést létesít. Az így előállított MJ26 vegyületet szabad karboxilcsoportján keresztül egy Boc-védett aminosavhoz hasonló módon kapcsoltam a GnRH lizinjének ϵ -aminocsoportjához, ami szintén savamid kötést alakít ki.

26. ábra: A [D-Lys⁶(crizotinib)]-GnRH-I konjugátum előállítása.

5.4.1 Életképesség gátló hatás EBC-1 sejtvonalon

A crizotinib-GnRH-I hatását a *c-Met* amplifikált, ezáltal a c-Met fehérjét túltermelő EBC-1 nem-kissejtes tüdőrák sejtvonalon hasonlítottuk össze a D-Lys⁶-GnRH-I-el és a racém crizotinibbel. A sejtek életképességét 72 órás kezelést követően, CellTiter-Glo[®] módszerrel határozzuk meg. A sejtek életképességének gátlását a koncentráció függvényében és a GraphPad Prism szoftverrel számított IC₅₀ értékeket a 27. ábra tartalmazza.



vegyület	viabilitás gátlás IC ₅₀
crizotinib (racém)	28 nM
[D-Lys ⁶ (crizotinib)]-GnRH-I	5,5 μM
D-Lys ⁶ -GnRH-I	>>10 μM

27. ábra: A [D-Lys⁶(crizotinib)]-GnRH-I daganatellenes hatása EBC-1 tüdőrák sejtvonalon.

Az EBC-1 sejtek életképességének 50%-os gátlását (IC_{50}), a crizotinib-GnRH-I megközelítőleg három nagyságrenddel magasabb koncentrációban (~5500 nM) eredményezi a racém crizotinibhez képest (28 nM). A D-Lys⁶-GnRH-I esetén, 0,6 nM és 10 μ M koncentráció-tartományban az EBC-1 sejtek életképességének csökkenését nem tapasztaluk.

5.4.2 c-Met-gátló hatás

A racém crizotinib és crizotinib-GnRH-I *in vitro* rekombináns c-Met-gátló hatásának vizsgálatát a Vichem Chemie Kutató Kft. (Budapest, Magyarország) végezte. Az eredmények alapján a crizotinib konjugált formában is nagyságrendileg a szabad crizotinibhez hasonló koncentrációban gátolja c-Met fehérjét. Vizsgálatuk megerősíti azt a feltételezést, hogy a piperidin gyűrűn keresztül konjugált crizotinib a GnRH peptiddel együtt is képes gátolni a c-Met fehérjét. A vizsgálati módszer leírása és az eredmények a mellékletben találhatóak.

További kutatómunkám során konjugálható crizotinib analógok és hatékonyabb konjugátumok előállítását, továbbá annak feltárását tűztem ki újabb célként, hogy miért csökken három nagyságrenddel a GnRH-konjugált crizotinib hatása az EBC-1 sejtvonalon.

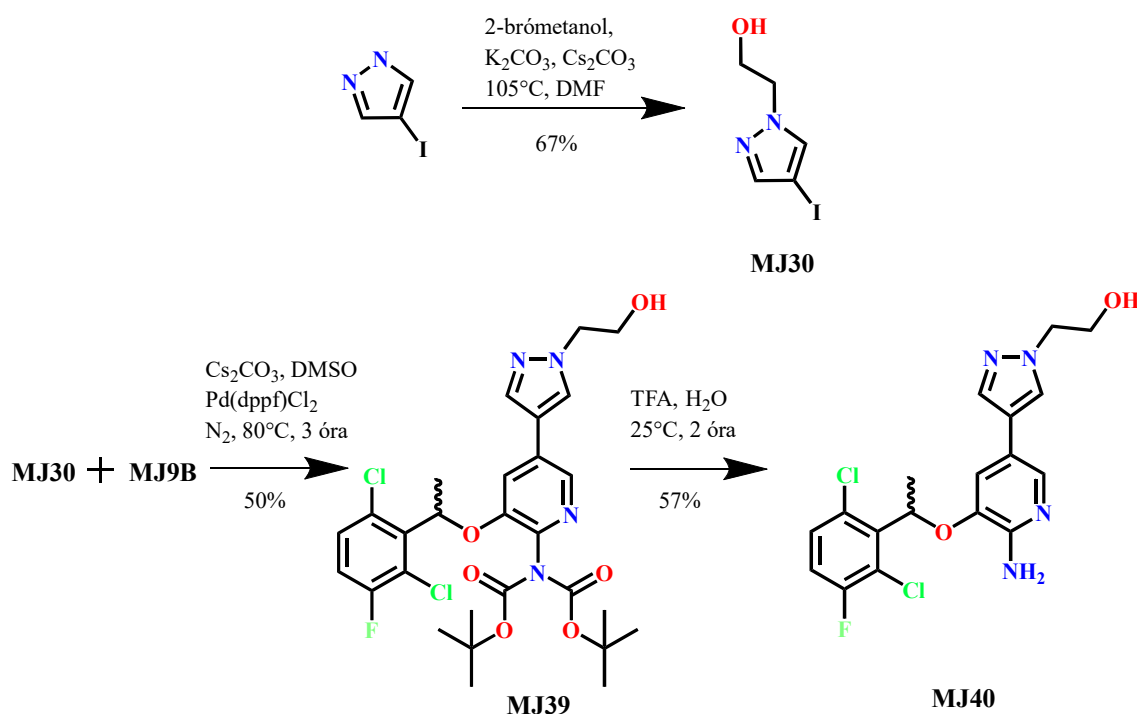
5.5 Crizotinib analógok

A crizotinib analógok szintézisének megtervezése során az egyik szempont a 2-aminopiridin alapváz aminocsoportjának szelektív Boc védeke volt. Egy további szempont a piperidin gyűrű módosításával észter- vagy karbamát kötés létesítésére alkalmas funkciós csoportok kialakítása volt. Az előállított vegyületekről a Boc védőcsoportot eltávolítva, először szabad hatóanyagként vizsgáltam daganatellenes hatásukat és fontosabb fizikai-kémiai paramétereiket, majd ezek alapján választottam ki a konjugálandó crizotinib analógokat.

5.5.1 Alifás hidroxilcsoporttal rendelkező crizotinib analógok előállítása

Az MJ40 crizotinib analóg előállítása a 28. ábrán látható. Az első lépésben jódpirazolból indultam ki, melyet etilén-karbonáttal reagáltattam. A terméket a racém MJ9B-vel Suzuki–Miyaura reakcióban kapcsoltam össze. A Boc védőcsoportokat

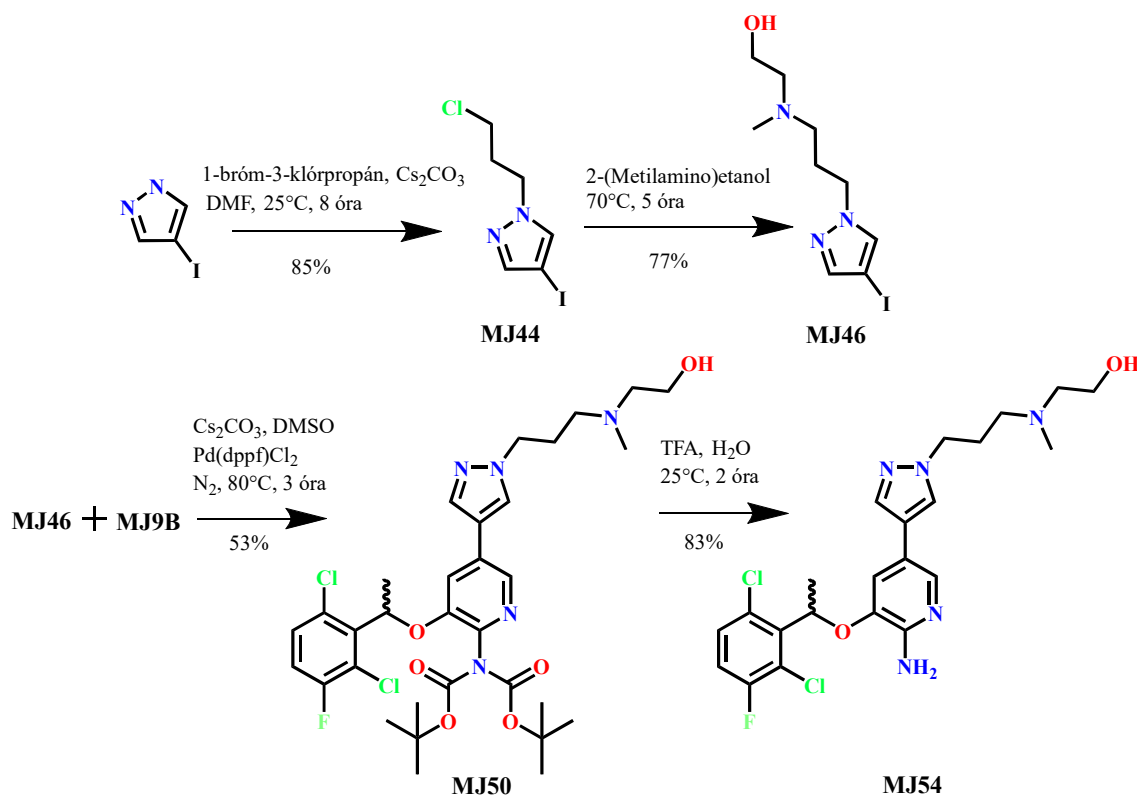
eltávolítva kaptam meg az MJ40 analógot. Az MJ40 esetében a crizotinib bázikus piperidin gyűrűjét egy 2-hidroxietyl csoport helyettesíti.



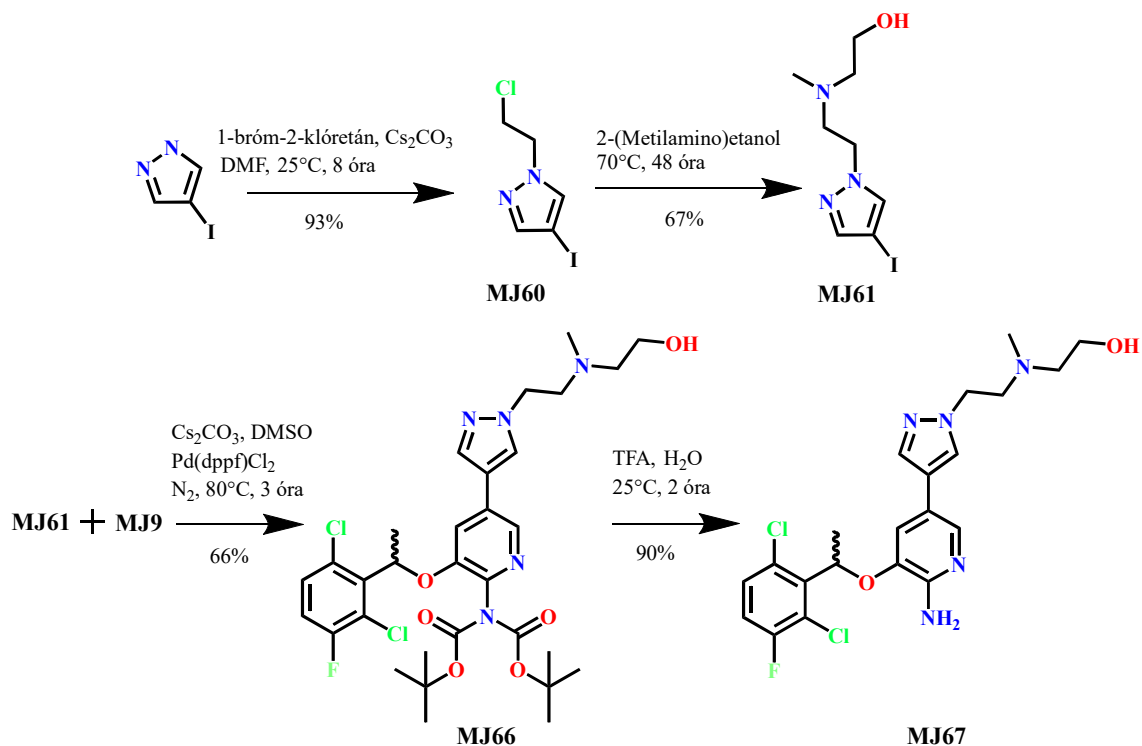
28. ábra: Az MJ40 crizotinib analóg szintézise.

Az MJ54 crizotinib analóg előállítása a 29. ábrán látható. Az első lépésben jódpirazolból indultam ki, melyet 1-bróm-3-klórpropánnal vittem reakcióba. A második lépésben az MJ44-et nagy feleslegben alkalmazott metilaminoetanollal reagáltattam. Az így kapott MJ46 terméket a racém MJ9B-vel Suzuki–Miyaura reakcióban kapcsoltam össze. A Boc védőcsoportokat eltávolítva kaptam meg az MJ54 analógot. Az MJ54 esetében a pirazol gyűrűtől három szénatom távolságra egy bázikus terciér aminocsoport található, melyhez egy 2-hidroxietyl csoport is kapcsolódik.

Az MJ67 crizotinib analóg előállítása a 30. ábrán látható. A reakcióút megegyezik az MJ54 szintézisével, azzal a különbséggel, hogy az MJ67 szintézisének első reakciólépésben reagensnek 1-bróm-2-klóretánt alkalmaztam. Ennek eredménye, hogy az MJ67 esetében a terciér aminocsoport egy szénatommal közelebb kerül a 2-aminopiridin alapvázhoz.



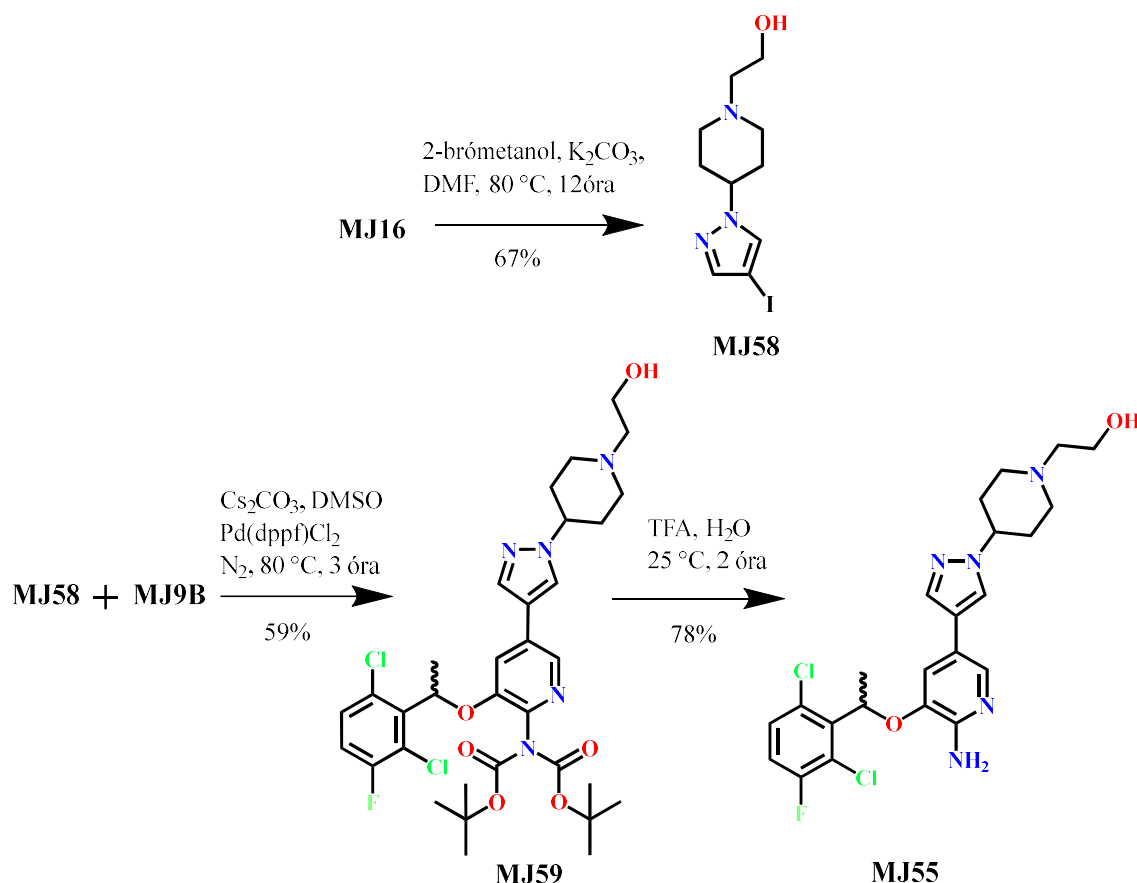
29. ábra: Az MJ54 crizotinib analóg szintézise.



30. ábra: Az MJ67 crizotinib analóg szintézise.

Az MJ55 crizotinib analóg előállítását a 31. ábrán látható. MJ16-ból indultam ki, melyet 2-brómetanollal reagáltattam. A MJ58 terméket racém, vagy enantiomer-tiszta MJ9B-vel kapcsolom össze Suzuki–Miyaura reakcióban. A Boc védőcsoportokat

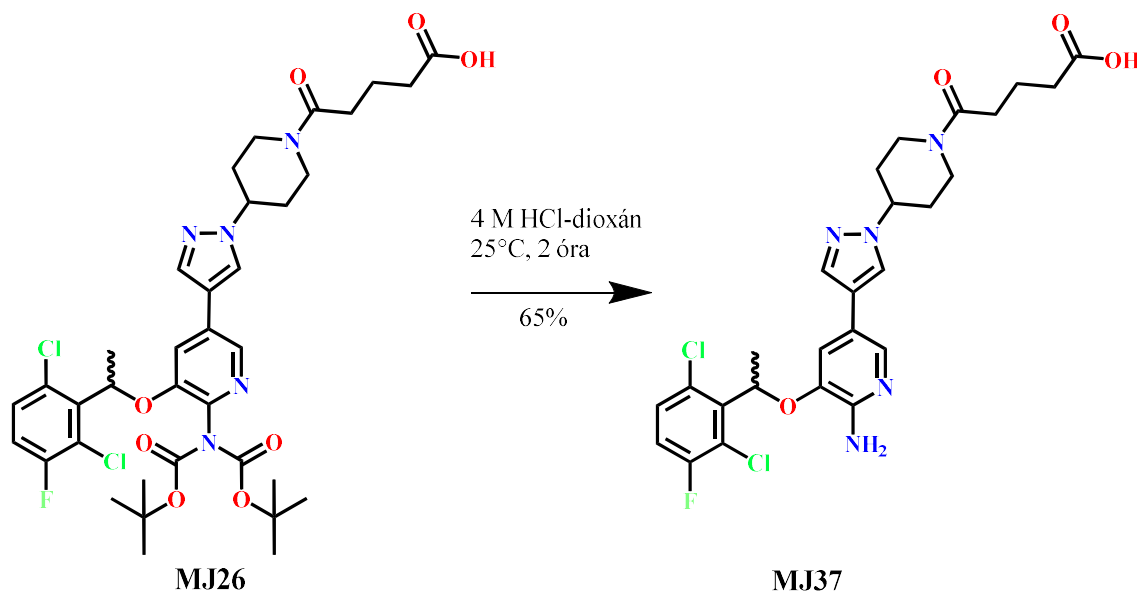
eltávolítva kaptam meg a racém MJ55, vagy az (R)-MJ55 analógot. Ezen vegyületek esetében a crizotinibben is megtalálható piperidin gyűrű nitrogénatomjához egy további 2-hidroxiethyl csoport kapcsolódik. Ennek következménye, hogy a piperidin bázikussága csökken, konjugált savának 9,4 pKa értéke megközelítőleg 8,6-ra változik (ChemDraw® szoftverrel végzett számítás alapján).



31. ábra: Az MJ55 crizotinib analóg szintézise.

5.5.2 További crizotinib analógok előállítása

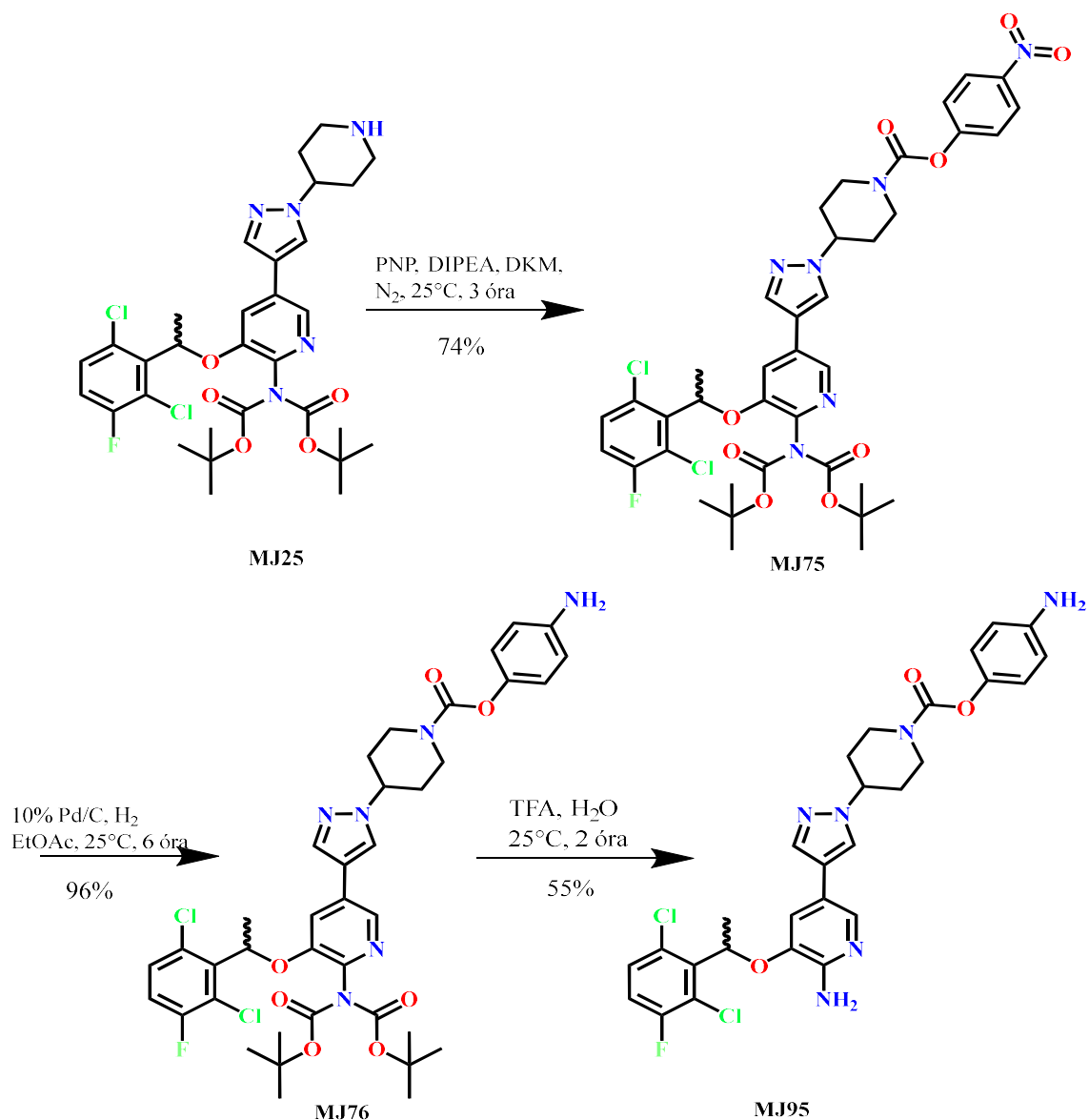
A hidroxilcsoporttal rendelkező crizotinib analógok mellett további konjugálható származékokat is előállítottam. A 32. ábrán látható módon, az MJ26 vegyületből a Boc védőcsoportok eltávolításával kaptam meg a glutársavval ellátott, szabad karboxil csoporttal rendelkező MJ37 crizotinib analógot. Ez a vegyület több szempontból is érdekesnek találtam. Egyrészt a karboxil csoportból aromás észter kötés is képezhető. Másrészt az MJ37 esetében a piperidin bázikus karaktere a savamid kötés miatt megszűnik. Továbbá a már előállított crizotinib-GnRH-I konjugátumban is megtalálható az MJ37 vegyület, mint egy stabil szerkezeti motívum. Az MJ37 vizsgálata tehát arról is információval szolgál, hogy hogyan befolyásolja a glutársav rész a crizotinib hatékonyságát és fizikai-kémiai paramétereit.



32. ábra: Az MJ37 crizotinib analóg szintézise.

Az MJ25 vegyületből kiindulva állítottam elő a karbamát kötést tartalmazó MJ95 analógot. Az MJ95 vegyület karbamát kötésének hidrolízisével crizotinib keletkezhet, tehát ezt az analógot egy olyan crizotinib „*prodrugnak*” terveztem, amelynek Boc védett változata GnRH konjugátum előállítására is alkalmas. A karbamát kötést további jelentősége, hogy jelenléte a piperidin bázikus karakterét eliminálja. A karbamát kötést *bis*(4-nitrofenil) karbonáttal alakítottam ki (MJ75), a következő lépésben a nitrocsoporthat palládium-katalizált hidrogénezéssel redukáltam aminocsoporttá (MJ76). A Boc védőcsoportok eltávolításával kaptam meg az MJ95 crizotinib analógot. Az MJ95 vegyület előállítása és szerkezete a 33. ábrán látható.

Az előállított crizotinib analógok kromatográfiás és tömegspektrometriás adatait a VIII. táblázat tartalmazza. A HPLC és MS felvételeket a melléklet tartalmazza.



33. ábra: Az MJ95 crizotinib analóg szintézise.

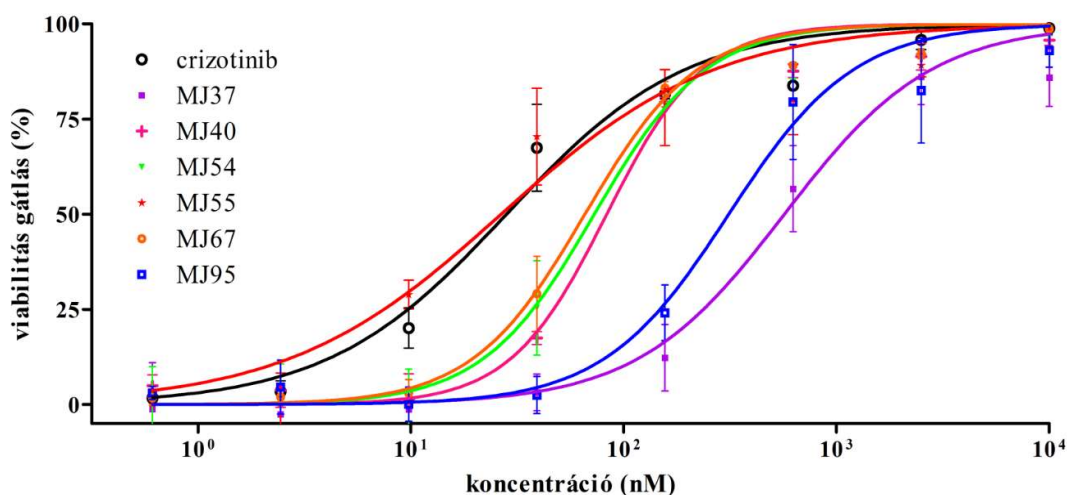
VIII. táblázat: A crizotinib analógok kromatográfiás és tömegspektrometriás adatai.

vegyület	HPLC-UV ^a		ESI-MS ^b	
	t _R (perc)	[M+H] ⁺ számított	[M+H] ⁺ mért	MW átlagos
crizotinib	7,52	450,12	450,23	450,34
MJ37	8,11	546,15	564,43	564,44
MJ40	7,94	411,07	411,25	411,26
MJ54	7,40	482,14	482,14	482,38
MJ55	7,44	494,14	494,17	494,39
MJ67	7,38	468,13	468,30	468,35
MJ95	7,84	585,15	585,10	585,46

^a HPLC I. módszer, detektálás: $\lambda = 254 \text{ nm}$ ^b Molekulatömeg meghatározás tömegspektrométerrel

5.5.3 Életképesség gátló hatás EBC-1 sejtvonalon

A racém crizotinib analógok daganatellenes hatását EBC-1 tüdőrák sejtvonalon, 72 órás kezelést követően, CellTiter-Glo® módszerrel mértük. A sejtek életképességének gátlását a kezelőszer koncentráció függvényében és a GraphPad Prism szoftverrel számított IC_{50} értékeket a 34. ábra tartalmazza.



vegyület (racém)	viabilitás gátlás IC_{50} (nM)
crizotinib	28
MJ37	569
MJ40	83
MJ54	73
MJ55	27
MJ67	66
MJ95	312

34. ábra: A crizotinib analógok vizsgálata EBC-1 tüdőrák sejtvonalon. SD; N=3

A leghatásosabb analógnak az MJ55 bizonyult, ami a crizotinibhez hasonló, 27 nM IC_{50} értékkel rendelkezik. A hidroxilcsoportot tartalmazó vegyületek közül az *in vitro* hatékonyság alapján az MJ55 analógot választottam ki. Az egyedi szerkezeti jellemzők miatt pedig a karboxilcsoporttal rendelkező MJ37 és a karbamát kötést tartalmazó MJ95 analógokat választottam ki további vizsgálatok céljából.

5.5.4 Oldhatóság és stabilitás

A crizotinib, MJ37, MJ55 és MJ95 stabilitását 10% FBS-t tartalmazó RPMI sejtenyészítő médiumban, 37°C-on, 2, 6 és 24 órás inkubálást követően HPLC-vel mértem (HPLC II. módszer). A kapott eredmények alapján megállapítható, hogy a crizotinib, MJ37, MJ55 vegyületek stabilak, illetve az MJ95 analógban található

karbamát kötés sem hidrolizál. Bomlástermék 24 órás inkubálást követően egyik vegyület esetében sem detektálható.

A crizotinib, MJ37, MJ55 és MJ95 oldhatóságát pH=7,4 PBS-ben mértem (detektálás: HPLC II. módszer). Az oldhatósági értékeket a IX. számú táblázat tartalmazza. Az MJ55 oldhatósága a crizotinibéhez hasonló, az MJ37 esetében a karboxilcsoport növeli az oldhatóságot. Az MJ95 PBS-ben gyakorlatilag nem oldódik, ezért ezt a vegyületet, mint szabad hatóanyagot nem vizsgáltam a továbbiakban.

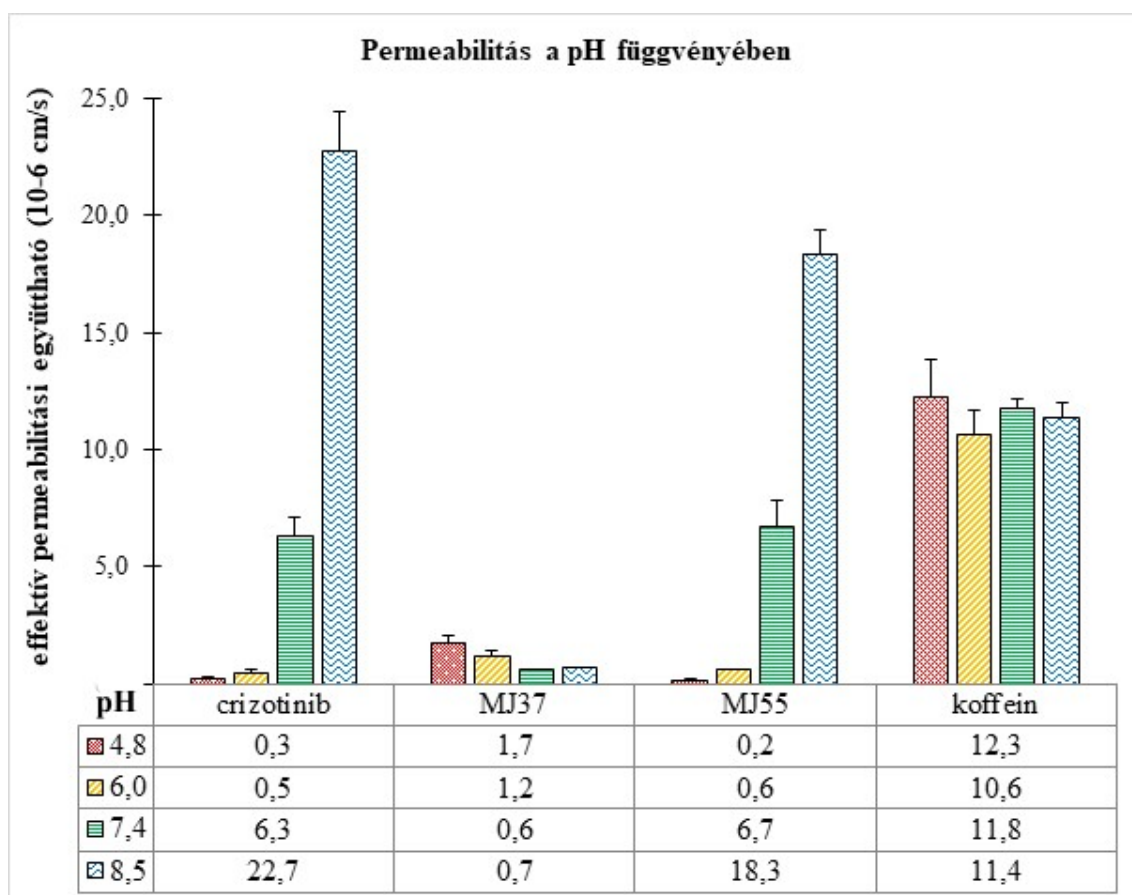
IX. táblázat: A crizotinib analógok kinetikai oldhatósága PBS-ben. N=3

vegyület	oldhatóság ^a (μM)
crizotinib	14±3
MJ37	99±8
MJ55	11±1
MJ95	<<1
^a PBS, pH= 7,4; 25°C; a mérési tartomány felső határa: 200 μM	

5.5.5 Permeabilitás a pH függvényében

A crizotinib, MJ37 és MJ55 permeabilitását 4,8-8,5 pH tartományban, mesterséges membránon vizsgáltam (PAMPA módszer). Kontrollnak a vizsgált pH tartományban nem ionizálódó koffeint alkalmaztam. A vizsgált vegyületek permeabilitását a 35. ábra tartalmazza.

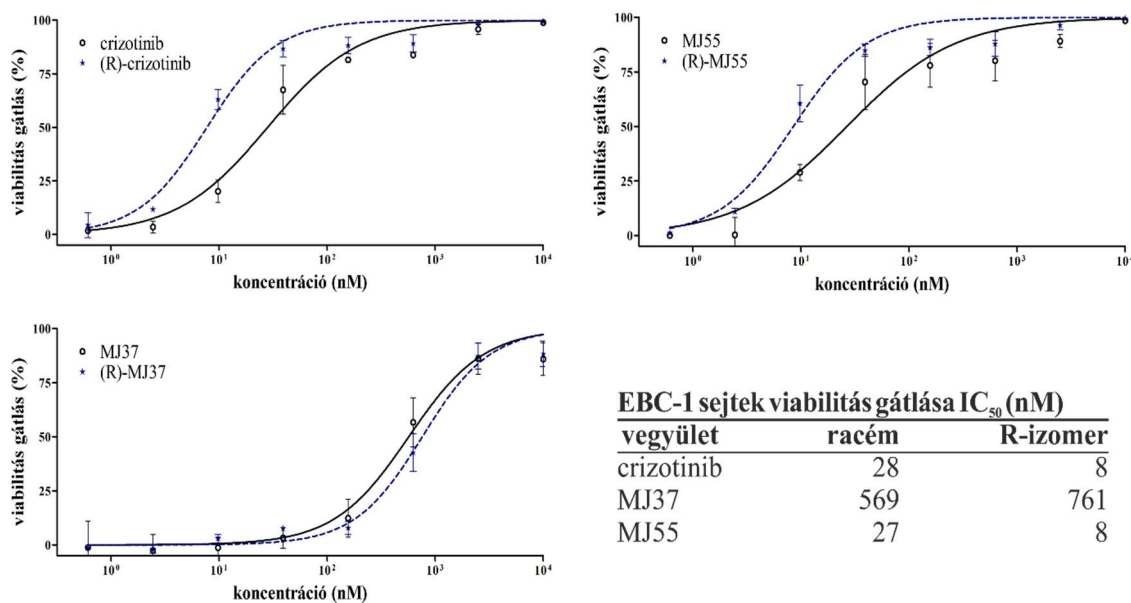
A koffein közepesnek mondható permeabilitása a pH függvényében nem változik, mért értéke a szakirodalmi adatokkal korrelál [200]. A bázikus karakterű crizotinib és MJ55 7,4-es, fiziológiás pH esetén alacsony permeabilitást mutatnak. Permeabilitásuk lúgosabb közegben jelentősen megnő, ez *per os* adagolásuk esetén a bélből történő felszívódásuk miatt előnyös. Azonban a fiziológiás pH-n már eleve alacsony permeabilitásuk pH=6 esetén még több mint egy nagyságrenddel csökken. A crizotinib és az MJ55 pH=4,8 esetén gyakorlatilag már nem permeabilisek. A karboxilcsoportot tartalmazó MJ37 analóg a vizsgált pH tartományban nagyon alacsony permeabilitással rendelkezik, permeabilitása savasabb pH esetén kissé fokozódik.



35. ábra: A crizotinib, MJ37 MJ55 és a koffein membrán-permeabilitása, pH= 4,8; 6,0; 7,4 és 8,5 esetén. SD; N=3

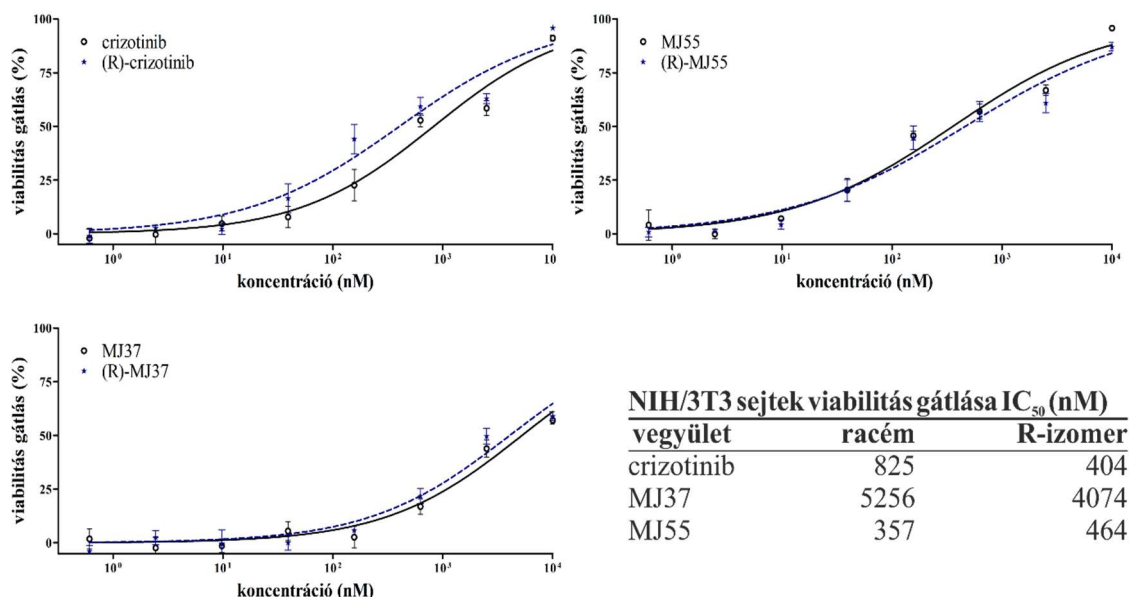
5.5.6 Enantiomer-tiszta analógok életképesség gátló hatása EBC-1 és NIH/3T3 sejtvonalakon

A crizotinib, MJ37 és MJ55 vegyületeknek előállítottam az enantiomer-tiszta, (R)-konfigurációjú változatát is. Daganatellenes hatékonyságukat az EBC-1 tüdőrák sejtvonalon 72 órás kezelést követően, CellTiter-Glo[®] módszerrel hasonlítottuk össze. A sejtek életképességének gátlását a kezelőszer koncentráció függvényében és a GraphPad Prism szoftverrel számított IC₅₀ értékeket a 36. ábra tartalmazza.



36. ábra: A racém és az enantiomer-tiszta crizotinib analógok vizsgálata EBC-1 tüdőrák sejtvonalon. SD; N=3

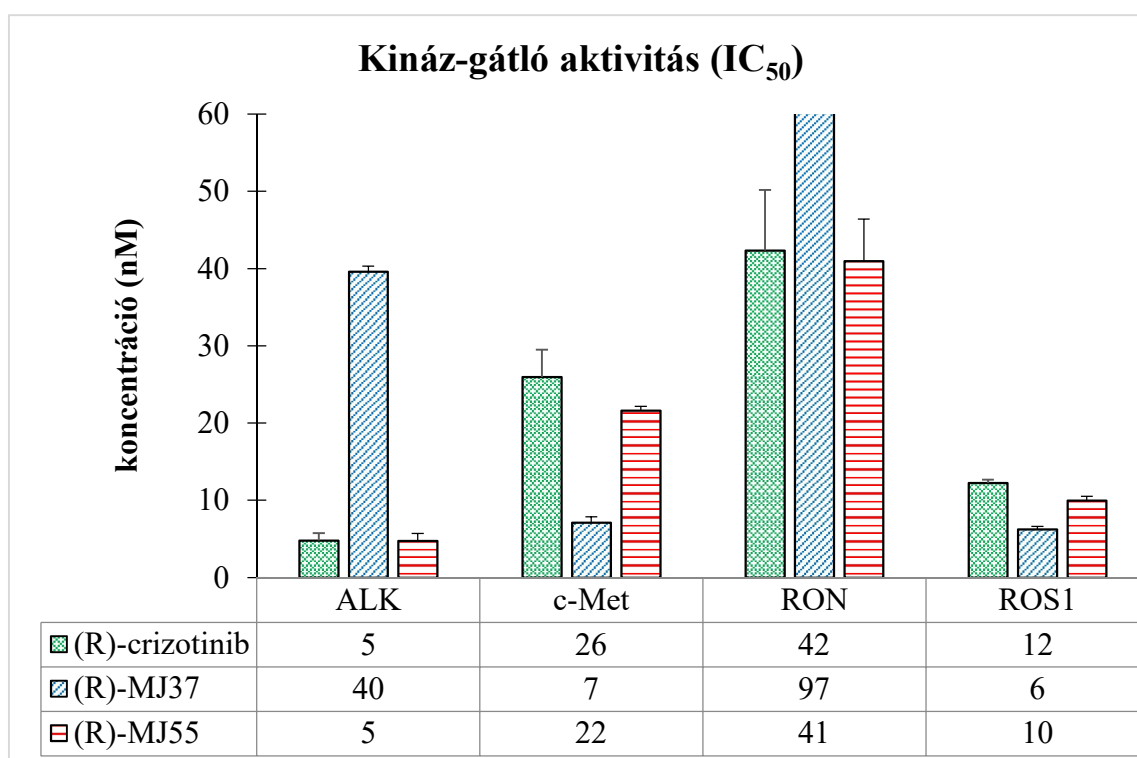
Az NIH/3T3 egér fibroblaszt sejtvonalon az EBC-1 sejtvonal esetén alkalmazott protokoll szerint mértük a racém és R-konfigurációjú hatóanyagok citotoxicitását. A kapott eredmények a 37. ábrán láthatóak. Megállapítható, hogy az egér fibroblaszt sejtvonalon az életképesség gátló hatás mind a három vegyület esetén szignifikánsan magasabb koncentrációban jelentkezik a tüdőrák sejtvonalhoz képest.



37. ábra: A racém és az enantiomer-tiszta crizotinib analógok vizsgálata NIH/3T3 egér fibroblaszt sejtvonalon. SD; N=3

5.5.7 Enantiomer-tiszta analógok *in vitro* kináz-gátlása

Az enantiomer-tiszta (R)-crizotinib, (R)-MJ37 és (R)-MJ55 esetén fontosnak tartottam meggyőződni közvetlen kináz-gátló hatékonyságukról is. Az ALK, c-MET, RON és ROS1 kinázok *in vitro* gátlásának vizsgálatát a ProQinase GmbH-t (Freiburg, Németország) végezte. A kapott eredmények a 38. ábrán láthatóak. Az (R)-MJ55 és az (R)-crizotinib hatékonysága mind a négy kináz esetén hasonló, a két vegyület között nincs szignifikáns különbség. Az (R)-MJ37 vegyület az ALK- és RON-gátlásban elmarad az (R)-crizotinibtól, azonban a c-MET és ROS1 esetén szignifikánsan hatékonyabb gátlószernek bizonyul.

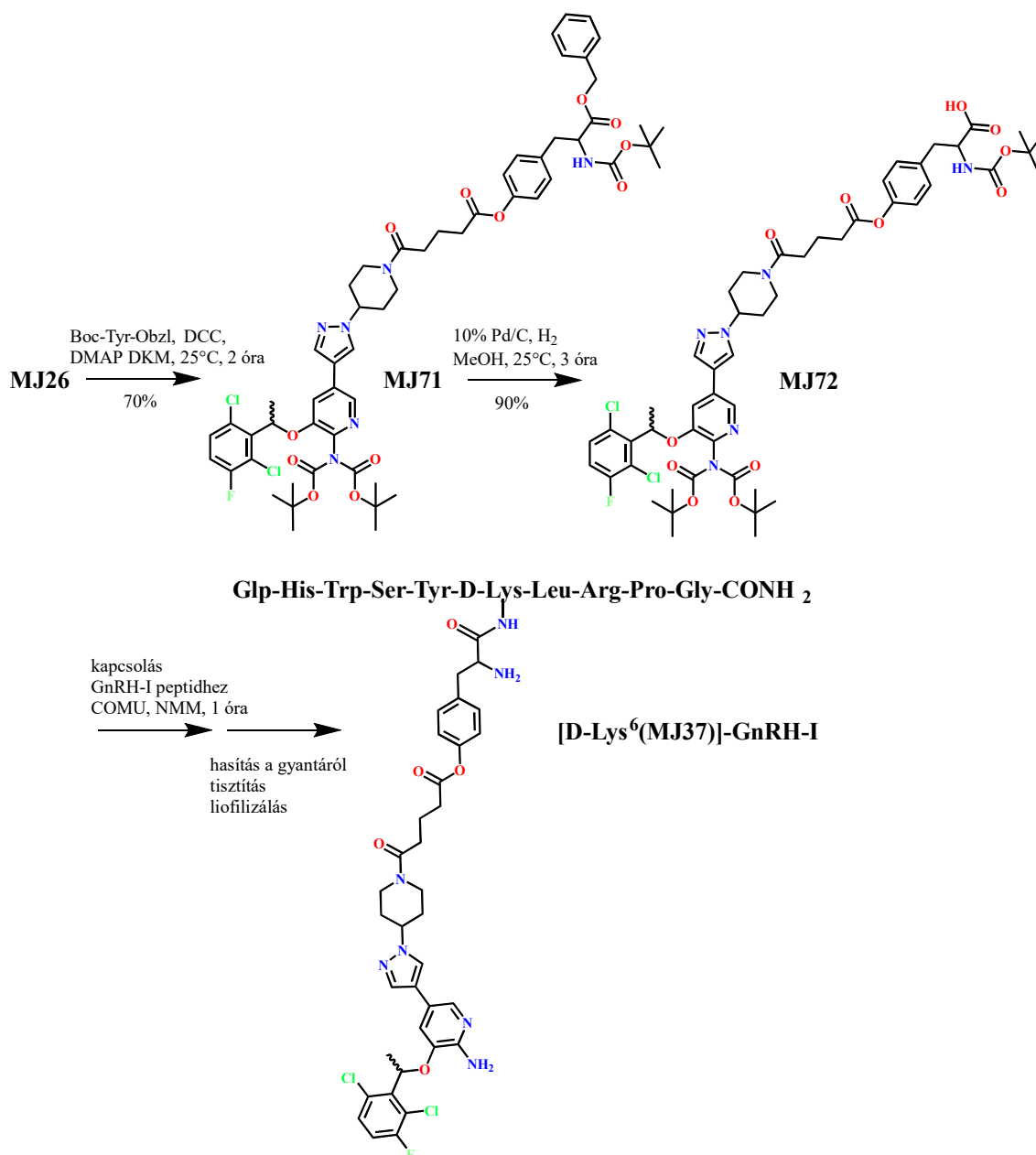


38. ábra: Az (R)-crizotinib, (R)-MJ37 és (R)-MJ55 analógok *in vitro* kináz-gátló hatékonysága. (A mérést a ProQinase GmbH végezte. SD; N=2)

5.6 Crizotinib analógokból előállított GnRH konjugátumok

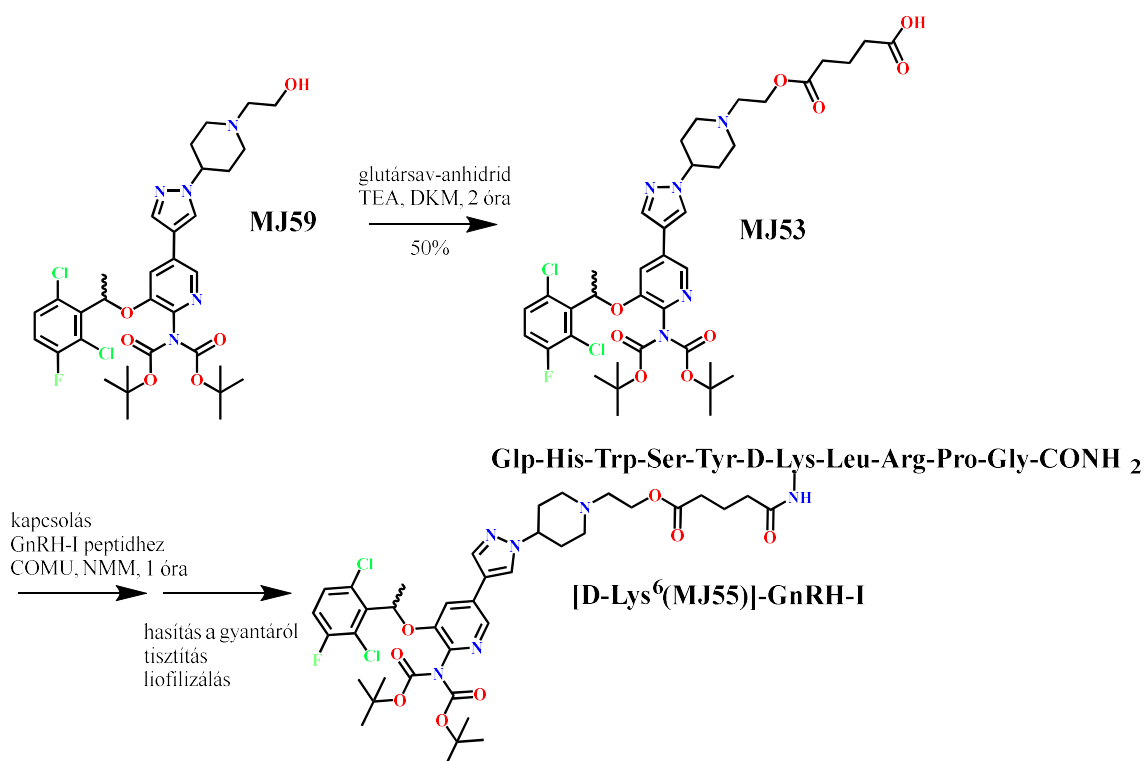
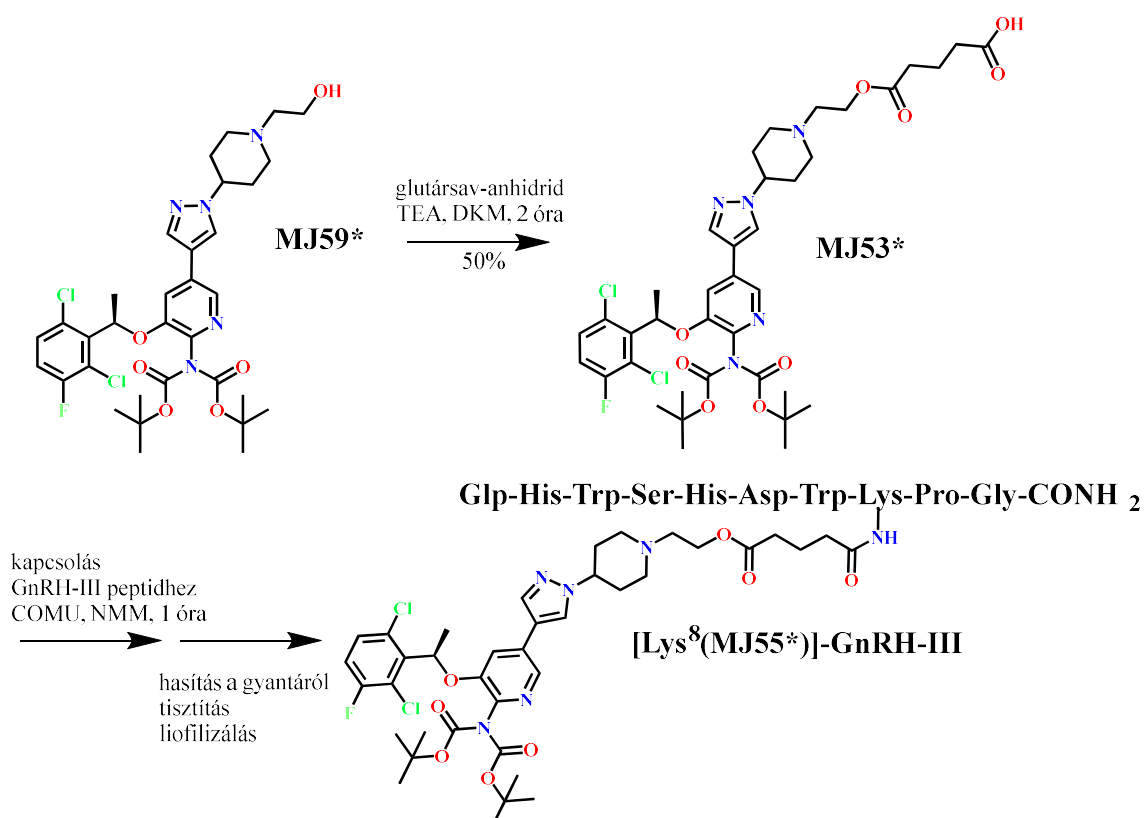
A GnRH konjugátumok előállításához a Boc védett, racém crizotinib analógokból indultam ki. Az [D-Lys⁶(MJ37)]-GnRH-I (továbbiakban: MJ37-GnRH-I) előállítása a 39. ábrán látható. Az MJ26 szabad karboxilcsoportjából észter kötést alakítottam ki. Reakciópartnernek Boc-L-Tyr-OBzl aminosavat választottam, melynek szabad fenolos hidroxilcsoportját használtam fel az észterkötés kialakítására (MJ71). A Bzl védőcsoportot palládium-katalizált hidrogénezéssel szelektíven távolítottam el (MJ72). Az MJ72 vegyületet felszabadított karboxilcsoportján keresztül egy Boc védett

aminosavhoz hasonló módon kapcsoltam a D-Lys⁶-GnRH-I lizinjének ε-aminocsoportjához.



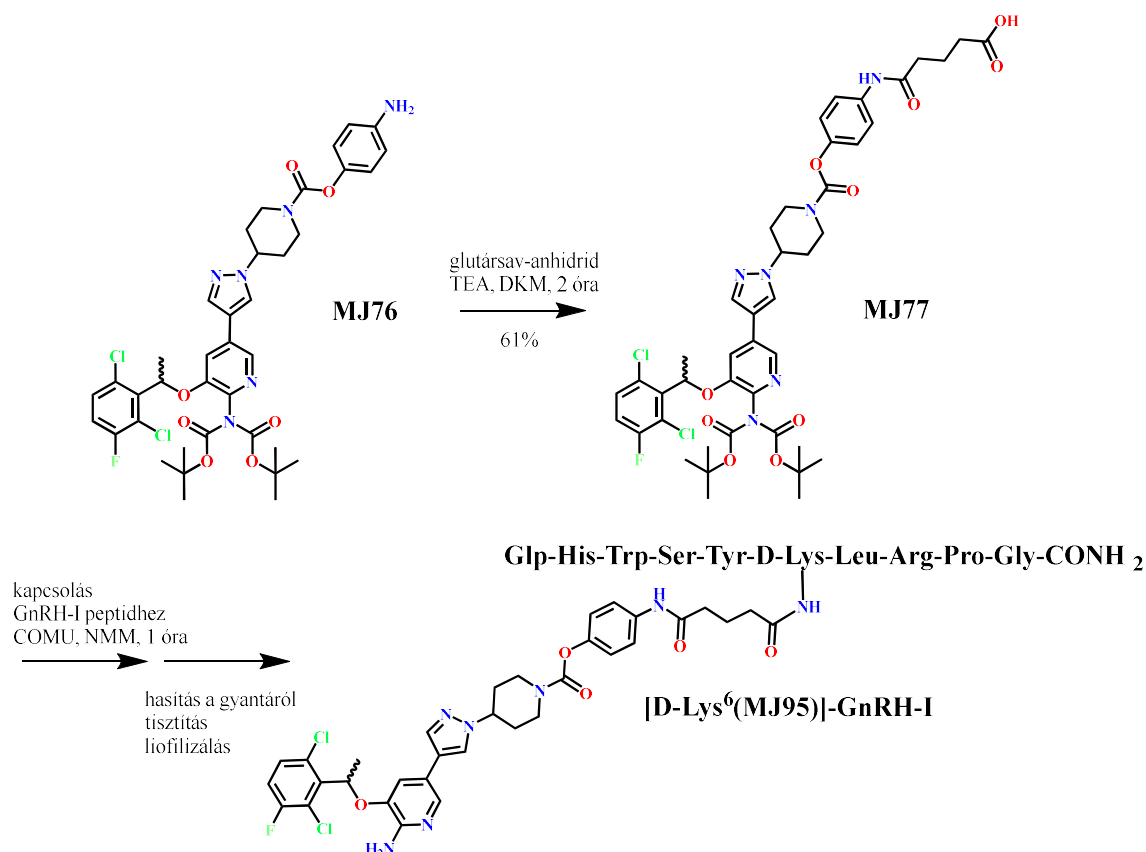
39. ábra: A [D-Lys⁶(MJ37)]-GnRH-I előállítása.

A [D-Lys⁶(MJ55)]-GnRH-I (továbbiakban: MJ55-GnRH-I) előállítása a 40. ábrán látható. Az MJ59 glutársavanhidriddel reagálva észterkötést alakít ki. Az MJ53 vegyületet a korábbi konjugátumokkal analóg módon kapcsoltam a D-Lys⁶-GnRH-I peptidhez. A [Lys⁸((R)-MJ55)]-GnRH-III (továbbiakban: (R)-MJ55-GnRH-III) esetén pedig enantiomer-tiszta (R)-MJ59 vegyületet kapcsoltam GnRH-III peptidhez (41. ábra).

40. ábra: A [D-Lys⁶(MJ55)]-GnRH-I előállítása.41. ábra: A [Lys⁸((R)-MJ55)]-GnRH-III előállítása.

A [D-Lys⁶(MJ95)]-GnRH-I (továbbiakban: MJ95-GnRH-I) konjugátum előállítása a 42. ábrán látható. A karbamát kötést tartalmazó Boc védett MJ76 vegyületből indultam

ki, amit glutársav-anhidriddel reagáltattam. Az így kapott MJ77 vegyületet a korábbi konjugátumokkal analóg módon kapcsoltam D-Lys⁶-GnRH-I peptidhez. A crizotinib-GnRH konjugátumok kromatográfiás és tömegspektrometriás adatait a X. táblázat tartalmazza. A HPLC és MS felvételeket a melléklet tartalmazza.



42. ábra: A [D-Lys⁶(MJ95)]-GnRH-I előállítása.

X. táblázat: A crizotinib-GnRH konjugátumok kromatográfiás és tömegspektrometriás adatai.

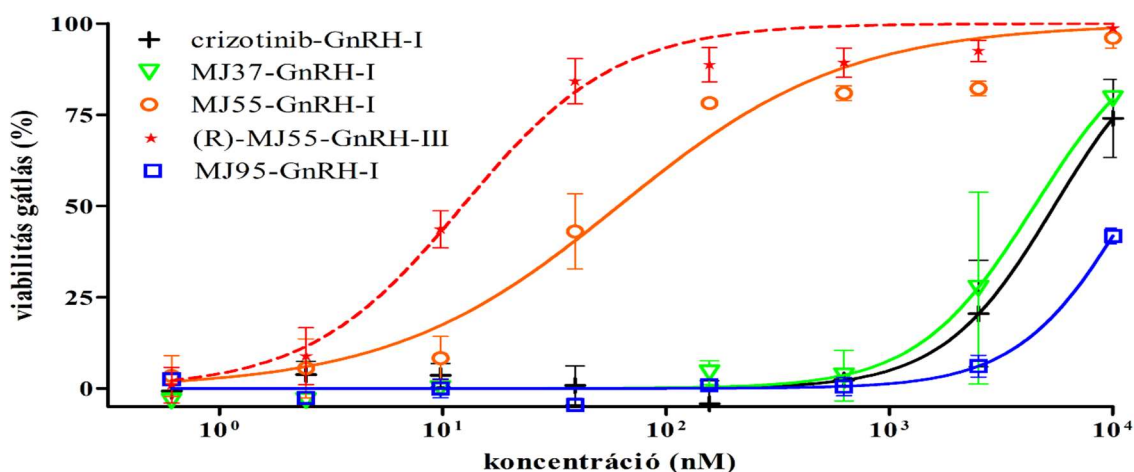
vegyület	HPLC-UV ^a		ESI-MS ^b	
	t _R (perc)	[M+3H] ³⁺ számított	[M+3H] ³⁺ mért	MW _{átlagos}
[D-Lys ⁶ (crizotinib)]-GnRH-I	10,54	600,1	600,8	1799,9
[D-Lys ⁶ (MJ37)]-GnRH-I	10,30	655,3	655,1	1963,0
[D-Lys ⁶ (MJ55)]-GnRH-I	9,88	615,6	615,4	1843,9
[Lys ⁸ ((R)-MJ55)]-GnRH-III	9,86	617,6	617,4	1849,8
[D-Lys ⁶ (MJ95)]-GnRH-I	11,16	646,0	645,8	1935,0

^a HPLC II. módszer, detektálás: λ= 220 nm
^b Molekulatömeg meghatározás tömegspektrométerrel

5.6.1 Életképesség gátló hatás EBC-1 és NIH/3T3 sejtvonalakon

Az előállított konjugátumok daganatellenes hatását EBC-1 tüdőrák sejtvonalon, 72 órás kezelést követően, CellTiter-Glo® módszerrel mértük. A sejtek életképességének gátlását a kezelőszer koncentráció függvényében és a GraphPad Prism szoftverrel számított IC_{50} értékeket a 43. ábra tartalmazza.

A crizotinib-GnRH-I 5,5 μM IC_{50} értékéhez viszonyítva, az észterkötéssel kapcsolt MJ55 analógok GnRH konjugátumai jelentősen hatásosabbnak bizonyultak. A leghatékonyabb az enantiomer-tiszta hatóanyagot tartalmazó (R)-MJ55-GnRH-III 12 nM IC_{50} értékkel, ezt követi az MJ55-GnRH-I 61 nM IC_{50} értékkel. Az aromás észterkötést tartalmazó MJ37-GnRH-I és crizotinib-GnRH-I IC_{50} értéke között nincs szignifikáns különbség. A karbamát kötéssel tartalmazó MJ95-GnRH-I hatása szignifikánsan a legkisebb.

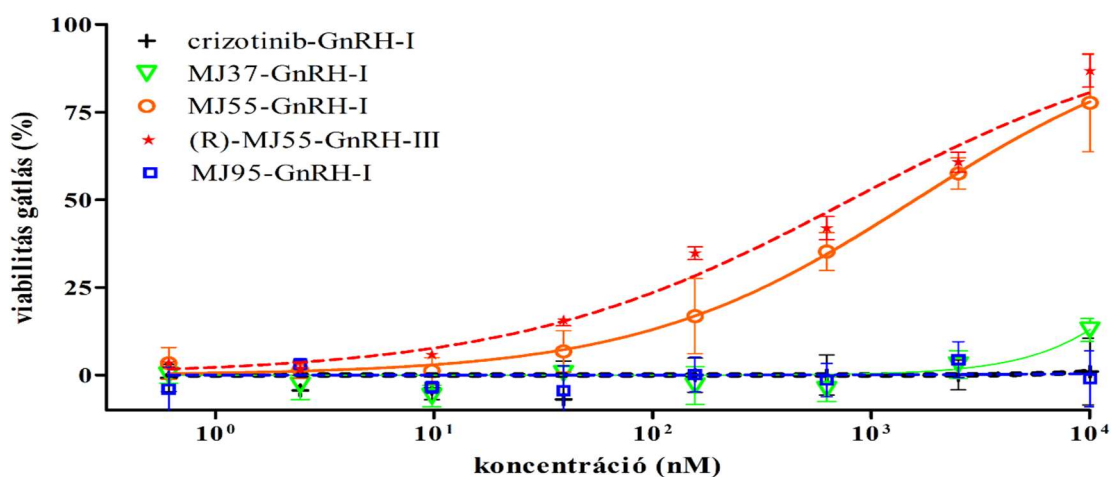


vegyület	viabilitás gátlás IC_{50}
[D-Lys ⁶ (crizotinib)]-GnRH-I	5,5 μM
[D-Lys ⁶ (MJ37)]-GnRH-I	4,5 μM
[D-Lys ⁶ (MJ55)]-GnRH-I	61 nM
[Lys ⁸ ((R)-MJ55)]-GnRH-III	12 nM
[D-Lys ⁶ (MJ95)]-GnRH-I	12,1 μM

43. ábra: A crizotinib-GnRH konjugátumok vizsgálata EBC-1 tüdőrák sejtvonalon. SD; N=3

Az NIH/3T3 egér fibroblaszt sejtvonalon az EBC-1 sejtvonal esetén alkalmazott protokoll szerint mértük a crizotinib-GnRH konjugátumok citotoxicitását. A kapott eredmények a 44. ábrán láthatóak. A szabad crizotinib analógokhoz hasonló módon (90. oldal, 36. és 37. ábrák), a crizotinib-GnRH konjugátumok esetén is megállapítható, hogy az egér fibroblaszt sejtvonalon az életképesség gátló hatás mindegyik konjugátum esetén

szignifikánsan magasabb koncentrációban jelentkezik a tüdőrák sejtvonalhoz képest. A crizotinib-GnRH-I és MJ95-GnRH-I még 10 μ M koncentrációban sem citotoxikus.

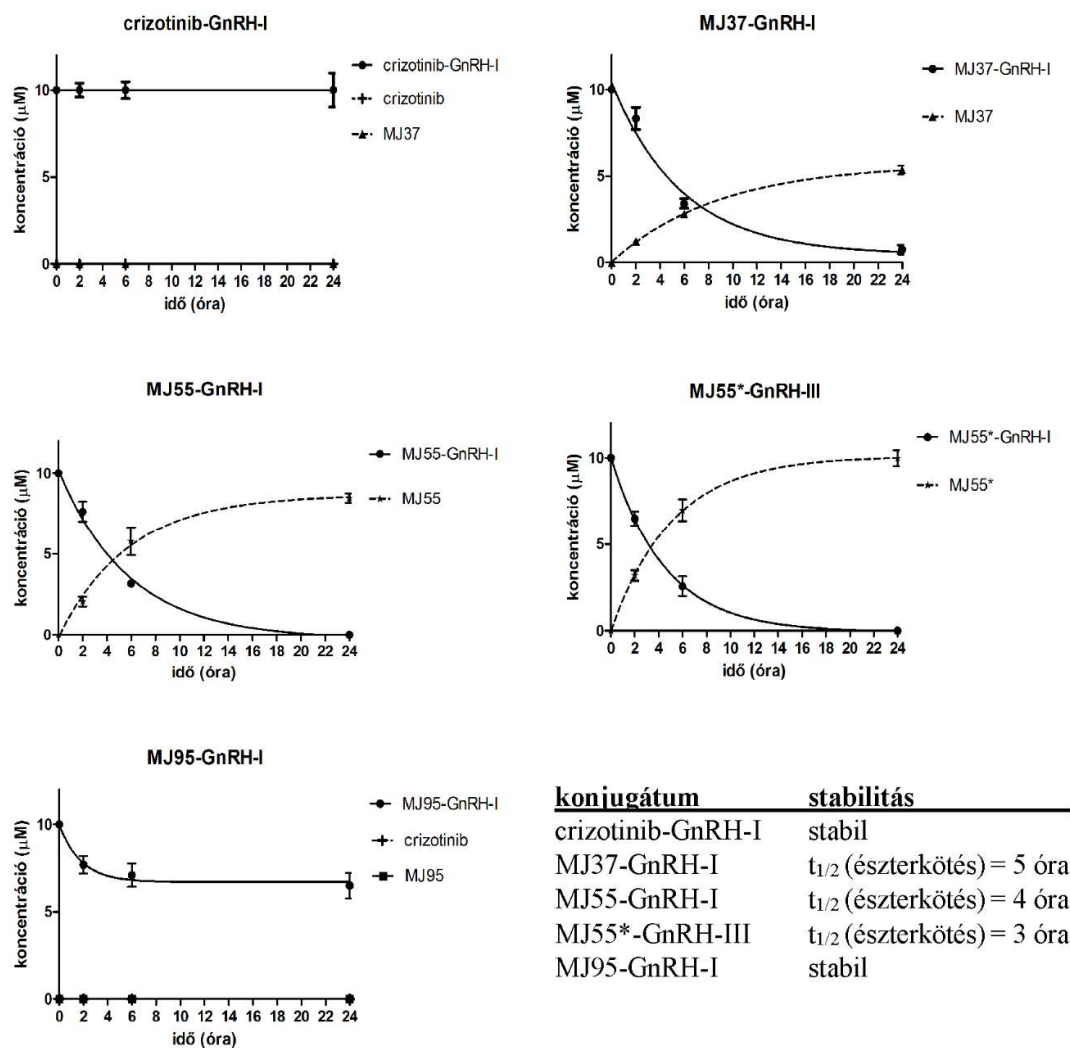


vegyület	viabilitás gátlás IC ₅₀
[D-Lys ⁶ (crizotinib)]-GnRH-I	>> 10 μ M
[D-Lys ⁶ (MJ37)]-GnRH-I	> 10 μ M
[D-Lys ⁶ (MJ55)]-GnRH-I	1,6 μ M
[Lys ⁸ ((R)-MJ55)]-GnRH-III	0,8 μ M
[D-Lys ⁶ (MJ95)]-GnRH-I	>> 10 μ M

44. ábra: A crizotinib GnRH konjugátumok vizsgálata NIH/3T3 egér fibroblaszt sejtvonalon. SD; N=3

5.6.2 Stabilitás

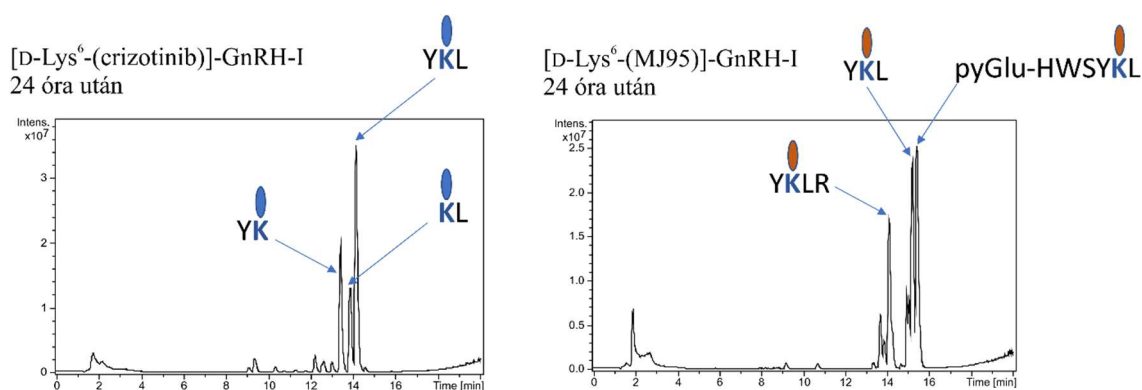
A konjugátumok stabilitása meghatározó szelektivitásuk és hatékonyságuk szempontjából. A stabilitást 10% FBS-t tartalmazó RPMI médiumban, 37°C-on, 2, 6 és 24 órás inkubálást követően HPLC-vel mértem. A 45. ábrán látható módon, a konjugátumok mennyisége mellett a szabad hatóanyagokat, mint a konjugátumokból felszabaduló stabil metabolitokat is detektáltam. Megállapítható, hogy a savamid és a karbamát kötést tartalmazó crizotinib-GnRH-I, illetve MJ95-GnRH-I konjugátumok stabilak, szabad hatóanyag 24 óra elteltével sem detektálható. Az aromás észterkötésű MJ37-GnRH-I, illetve az alifás észterkötésű MJ55-GnRH-I és (R)-MJ55-GnRH-III konjugátumok azonban gyorsan bomlanak. Az alifás észterkötés sejtenyésző médiumban 24 óra alatt gyakorlatilag teljesen hidrolizál, felszabadítva az MJ55 analógot. Az aromás észterkötés az alifáshoz képest kissé stabilabb.



45. ábra: A crizotinib-GnRH konjugátumok stabilitása sejtenyésző médiumban.

A sejtenyésző médiumban stabil crizotinib-GnRH-I és MJ95-GnRH-I konjugátumok, illetve a bennük található crizotinib és MJ95 vegyületek stabilitását patkány májsejtek lizoszóma preparátumában az ELTE Analitikai Kémiai Tanszékén vizsgáltuk. A mérési módszert a melléklet tartalmazza.

Az eredmények alapján a crizotinib és az MJ95 stabil. Mivel az MJ95 karbamát kötése lizoszomális enzimek hatására sem hasad fel, ezért belőle szabad crizotinib sem keletkezik, tehát „prodrug” helyett önálló hatóanyagnak tekinthető. A crizotinib-GnRH-I és MJ95-GnRH-I esetén a peptidlánc időfüggő degradációja jól követhető, azonban szabad hatóanyag a meghatározási határ feletti mennyiségben egyik konjugátum esetén sem detektálható. A 46. ábrán látható, hogy a hatóanyagot tartalmazó legkisebb tömegű metabolitok a crizotinib-GnRH-I esetén di-, vagy tripeptidek, az MJ95-GnRH-I esetén tripeptid, vagy még több aminosavat tartalmazó peptid-fragmensek.



46. ábra: A [D-Lys⁶(crizotinib)]-GnRH-I és [D-Lys⁶(MJ95)]-GnRH-I konjugátum LC-MS felvételei, 24 órá, 37°C-on történő inkubálást követően, lizoszóma preparátum jelenlétében. (A crizotinib kék, az MJ95 barna színnel van jelölve.)

5.6.3 Oldhatóság és permeabilitás

A D-Lys⁶-GnRH-I és GnRH-III peptidek PBS-ben mért oldhatósága a crizotinib analógok konjugálása következtében nagyon lecsökken, a konjugátumok szobahőmérsékleten alig oldódnak. Ezért a crizotinib-GnRH konjugátumok oldhatóságát RPMI sejttenyésztő médiumban 37°C-on is megmértem. Az eredményeket a XI. számú táblázat tartalmazza. A oldhatóság sejttenyésztő médiumban jelentősen nagyobb, mint PBS esetén, és a konjugátumok oldhatósága között számottevő eltérés tapasztalható. FITC-GnRH konjugátumokhoz hasonló módon a GnRH-III-mat tartalmazó konjugátum kedvezőbb oldhatósága itt is megmutatkozik.

XI. táblázat: A crizotinib-GnRH konjugátumok kinetikai oldhatósága. SD, N=3

vegyület	oldhatóság	
	PBS; pH=7,4; T=25°C	RPMI médium, T=37°C
crizotinib-GnRH-I	~1 µM	29 ±4 µM
MJ37-GnRH-I	<1 µM	4 ±1 µM
MJ55-GnRH-I	~1 µM	14 ±3 µM
(R)-MJ55-GnRH-III	1-2 µM	48 ±12 µM
MJ95-GnRH-I	<<1 µM	~1 µM

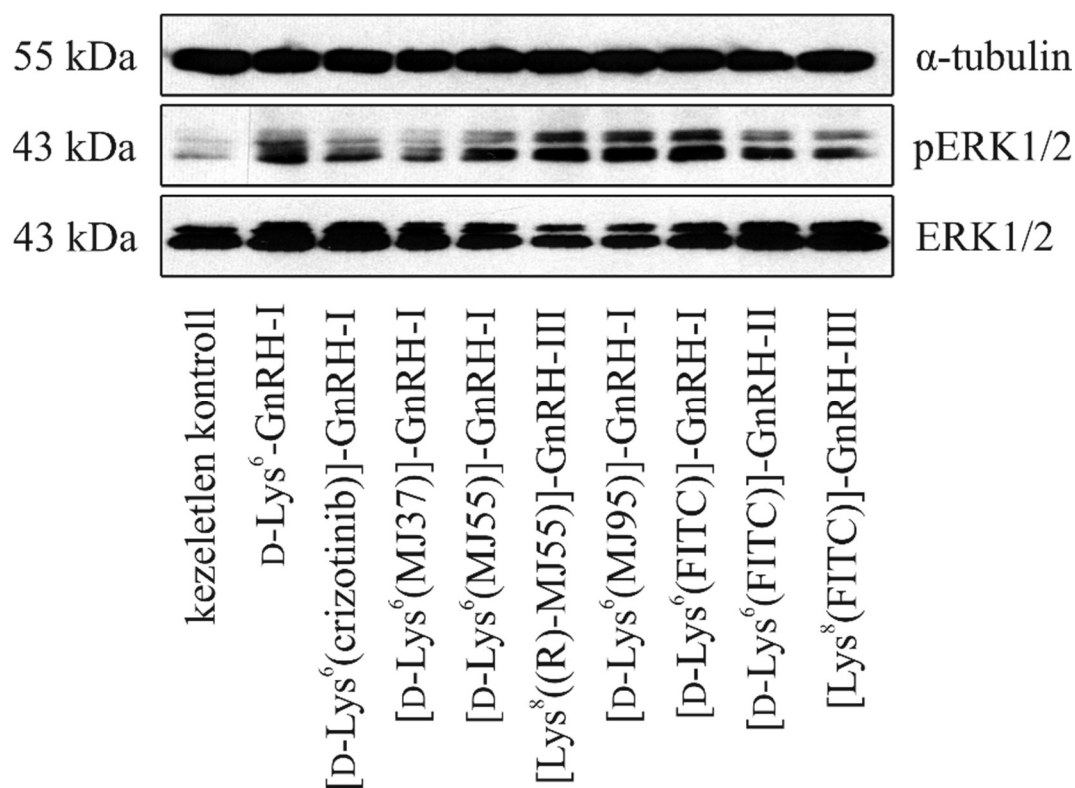
Mesterséges membránon, PAMPA módszerrel vizsgáltam a sejttenyésztő médiumban stabil crizotinib-GnRH-I és MJ95-GnRH-I konjugátumok permeabilitását. Az eredmények megerősítik, hogy a FITC jelölt GnRH analógokhoz hasonló módon, ezek a konjugátumok sem képesek passzív diffúzióval átjutni a sejtmembránon. Az

észterkötést tartalmazó konjugátumokat bomlékonyságuk miatt ebben a kísérletben nem vizsgáltam.

5.6.4 Kötődés a GnRH receptorhoz

A GnRH-R ligandum kötés hatására, közvetett módon, erőteljes ERK1/2 foszforilációt indukál [180, 201]. A GnRH-R-kötődést a fokozottan GnRH-R expresszáló, de mérsékelten ERK1/2-aktív LNCaP prosztatarák sejtvonalon vizsgáltuk, 1 μ M koncentrációban, 15 percig kezelve a sejteket. Negatív kontrollnak kezeletlen sejteket, pozitív kontrollnak a GnRH-R agonista D-Lys⁶-GnRH-I-et, valamint a már bemutatott FITC-jelölt GnRH konjugátumokat alkalmaztam.

A 47. ábrán látható eredmények igazolják, hogy a kezeletlen sejtek esetén a foszforilált ERK1/2 (pERK1/2) mennyisége alacsony. A D-Lys⁶-GnRH-I, valamint a FITC-jelölt GnRH analógokkal kezelt sejtekhez hasonló módon a crizotinib-GnRH konjugátumokkal kezelt sejtek esetén is a pERK1/2 mennyisége nő. A GnRH-R által kiváltott erőteljes ERK1/2 aktiváció igazolja, hogy a crizotinib-GnRH konjugátumok is kötődnek a GnRH receptorhoz.



47. ábra: GnRH-R-kötődés vizsgálat, LNCaP sejtvonalon, western blot módszerrel.

5.6.5 GnRH-irányított hatóanyagtranszport hatása

Összehasonlítottam a crizotinib-GnRH konjugátumok EBC-1 tüdőrák sejteken mért életképesség gátló hatását a hozzájuk kapcsolt hatóanyagok szabad formájával. Az IC_{50} értékekből számított konjugátum/hatóanyag hányadost a XII. táblázat tartalmazza. Megállapítható, hogy egyik konjugátum sem hatásosabb, mint a benne található hatóanyag szabad formájában. Megfigyelhető, hogy konjugátumok daganatellenes hatása a hatóanyaggal létesített kémiai kötés stabilitásával fordítottan arányos.

XII. táblázat: A konjugált és a szabad crizotinib analógok EBC-1 tüdőrák sejtvonalon mért életképesség gátló hatásának összehasonlítása.

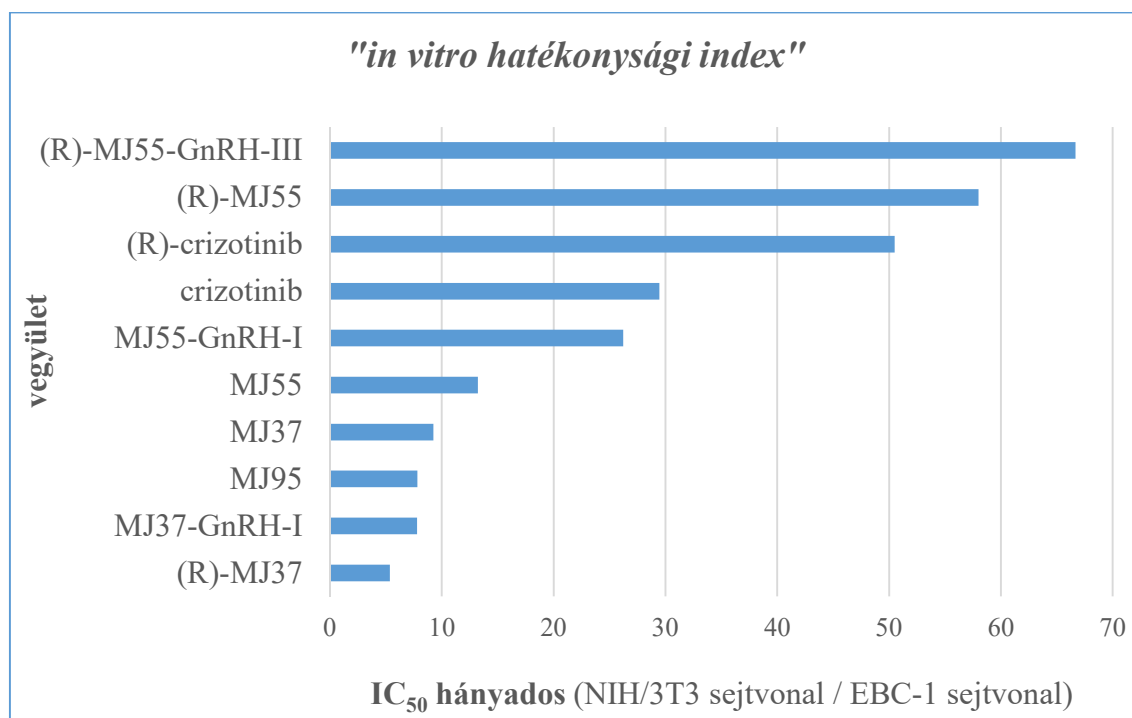
konjugátum	hatóanyag	stabilitás* $t_{1/2}$	IC_{50} arány** konjugátum/hatóanyag
(R)-MJ55-GnRH-III	(R)-MJ55	3 óra	1,4
MJ55-GnRH-I	MJ55	4 óra	2,3
MJ37-GnRH-I	MJ37	5 óra	7,9
MJ95-GnRH-I	MJ95 (crizotinib)	stabil	39 (432)
crizotinib-GnRH-I	crizotinib	stabil	196

*: A hatóanyaggal létesített kémiai kötés felezési ideje, 10% FBS-t tartalmazó RPMI sejttenyésztő médiumban, 37°C-on.

A további összehasonlítás érdekében a crizotinib analógok és konjugátumaik EBC-1 és NIH/3T3 sejteken mért IC_{50} értékeinek hányadosát kiszámítottam. Az így kapott értékek a citotoxikus hatás és a terápiás hatás közötti arányt számszerűsítik, amit disszertációmban, mint „*in vitro hatékonysági index*”-et definiáltam. Az *in vitro hatékonysági index* a statisztikai valószínűséget nem veszi figyelembe. Mivel a crizotinib-GnRH-I és MJ95-GnRH-I NIH/3T3 sejteken 10 μ M-ig nem mutattak citotoxicitást, így ennek a két konjugátumnak az *in vitro hatékonysági indexét* nem tudtam számszerűsíteni, továbbá az EBC-1 sejteken mért magas IC_{50} értékükre és oldhatósági korlátukra való tekintettel, ezzel nem is próbálkoztam. Az MJ37-GnRH-I esetén a GraphPad által a NIH/3T3 sejtek életképességének gátlására becsült 35 μ M IC_{50} értékkel számoltam.

Az eredmények a 48. ábrán láthatóak. Az összehasonlítás alapján a klinikumban alkalmazott (R)-crizotinibnél az (R)-MJ55, valamint az (R)-MJ55-GnRH-III hatékonyabbnak bizonyult. Az MJ37 vegyület *in vitro hatékonysági indexe* a GnRH-I

konjugálás következtében érdemben nem változott. Az MJ55 GnRH-I konjugálása és (R)-MJ55 GnRH-III konjugálása esetén az *in vitro* hatékonysági index kis mértékben nőtt.



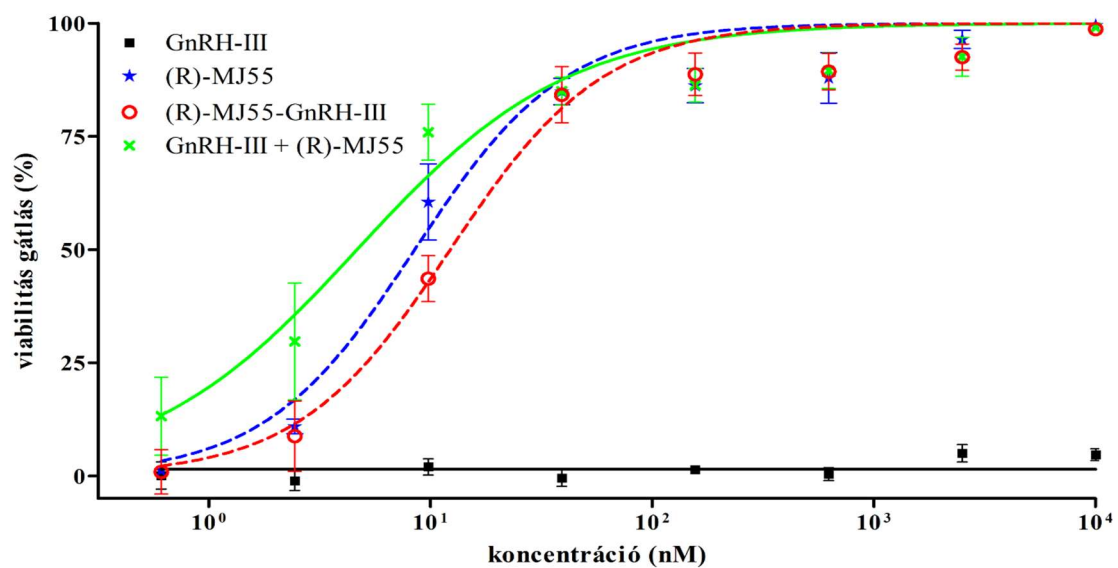
48. ábra: A konjugált és a szabad crizotinib analógok NIH/3T3 és EBC-1 sejt vonalon számított, „*in vitro* hatékonysági indexe”.

Az EBC-1 tüdőrák sejt vonalon, 72 órás kezelést követően, CellTiter-Glo® módszerrel hasonlítottam össze a GnRH-III, az (R)-MJ55, az (R)-MJ55-GnRH-III konjugátum és a GnRH-III-mal 1:1 arányban kombinált szabad (R)-MJ55 daganatellenes hatását. A sejtek életképességének gátlását a kezelőszer koncentráció függvényében és a GraphPad Prism szoftverrel számított IC₅₀ értékeket a 49. ábra tartalmazza.

Megállapítható, hogy (R)-MJ55-GnRH-III konjugátum 12,3 nM IC₅₀ értéke szignifikánsan magasabb, mint a szabad (R)-MJ55 analóg és GnRH-III kombinációja esetén mért 4,7 nM IC₅₀ érték. A szabad (R)-MJ55 analóg 8,5 nM IC₅₀ értéke a két érték közé esik, azonban a különbség sem a konjugátumhoz, sem pedig a kombinációs kezeléshez viszonyítva nem szignifikáns. A hatóanyagot nem tartalmazó GnRH-III esetén az EBC-1 sejt vonalon nem tapasztaltunk számottevő daganatellenes hatást.

A CompuSyn hatóanyag kombinációk közötti szinergizmus számítására alkalmazott szoftver (<http://www.combosyn.com>). A program a koncentráció-hatás adatpárok alapján számítja ki a vizsgált hatóanyagok kombinációs indexét (CI). A CompuSyn az adatok szórását nem veszi figyelembe, ezért az eredmények statisztikai valószínűsége sem állapítható meg. A GnRH-III és (R)-MJ55 kombináció esetén a CompuSyn által megadott

kombinációs index az 50%-os hatás ($Fa=0,5$) esetén 0,26. A programfejlesztők definíciója szerint a GnRH-III és (R)-MJ55 kombinációja esetén erős szinergizmus állapítható meg ($CI<0,3$). Érdekességképp, a konjugátum esetén elvégzett számítás alapján, $Fa=0,5$ esetén, a konjugált GnRH-III és (R)-MJ55 között számított CI index 1,41, ami a két komponens mérsékelt antagonizmusára utal ($1,2<CI<1,45$). Az eredmények alapján, meglepő módon arra lehet következtetni, hogy az EBC-1 tüdőráksejtek esetén a konjugált (R)-MJ55 életképesség gátló hatását a GnRH-III, mint daganatellenes peptid fokozza, azonban mint hatóanyag-szállító rendszer csökkenni.



vegyület	viabilitás gátlás IC_{50}
GnRH-III	nem mérhető
(R)-MJ55	8,5 nM
[Lys ⁸ ((R)-MJ55)]-GnRH-III (konjugátum)	12,3 nM
(R)-MJ55 + GnRH-III (kombináció)	4,7 nM

49. ábra: Az (R)-MJ55 daganatellenes hatása EBC-1 tüdőrák sejtvonalon GnRH-III konjugáció, illetve 1:1 arányú kombináció esetén.

6. Megbeszélés

PhD kutatómunkám során célzott daganatellenes hatóanyagok fejlesztésével foglalkoztam. A különféle GnRH peptidek, mint hatóanyag-szállító rendszerek ígéretes terápiás lehetőséget jelentenek a daganatok gyógyszeres kezelésére [91]. A közelmúltban számos daganatellenes hatóanyag hatékonyságát és szelektivitását próbálták növelni GnRH analógok segítségével. Egyes hatóanyagok esetében a hatás elmaradt a várttól, de számos vegyület esetén preklinikai kísérletekben sikerült igazolni a GnRH-irányított hatóanyagleadás előnyeit [165]. Azonban a több évtizede tartó intenzív kutatások ellenére még egyetlen daganatellenes GnRH konjugátum sem kapott klinikai engedélyt. Ez a tény felhívja a figyelmet annak jelentőségére, hogy sok ellentmondásos eredmény és megválaszolatlan kérdés jellemzi a GnRH receptorok és ligandjaik funkcióját és viselkedését [91, 155].

A GnRH-R-célzott terápia céljából vizsgált daganattípusok és a vizsgálati módszerek továbbra is korlátozottak a szakirodalomban. Az eredmények többnyire csak mRNS, vagy totál GnRH-R fehérje (sejtlizátum, vagy permeabilizált sejtek) szintjén igazolják a GnRH-R jelenlétét, esetleg fokozott expresszióját. Azonban a GnRH receptorok jellegzetessége, hogy csak igen kis hányaduk helyeződik ki a membránba, melynek okát, szabályozását pontosan még nem ismerjük [194]. Mindenesetre az aktív, sejtfelszíni receptorok mennyisége az, ami lényegében meghatározza, hogy egy sejt mennyire hatékony célpontja lehet a GnRH konjugátumoknak. A sejtfelszíni receptorok mennyiségének vizsgálatára főként izotópjelölt GnRH analógokat állítottak elő, melyek nagy érzékenységű detektálásuknak köszönhetően receptor affinitás vizsgálatára is kiválóan alkalmasak. A közelmúltban daganatok képalkotására is kifejlesztettek radiojelzett GnRH analógokat, melyek szintén a GnRH receptorok csekély mennyiségét igazolták a tumorsejtek felszínén [191].

Mindezekkel összefügg, hogy nem minden GnRH-R expresszáló daganattípus esetén sikerült daganatellenes konjugátumok hatásával is bizonyítani, hogy a fokozott GnRH-R expressziójuk alkalmas célponttá teszi őket [169]. Ezért meglátásom szerint a GnRH-R expresszió, önmagában nem elegendő bizonyíték arra, hogy egy daganat hatékony célpontja-e a GnRH célzott terápiának. A kevesebbet vizsgált sejtfelszíni GnRH-R mennyisége pontosabb predikciót eredményezhet, de még ebben az esetben is bizonyitanaságra adhat okot a GnRH-R változékony membrán-transzlokációja. A GnRH-

R kihelyeződése a membránba sejttípus-függő módon indukálható különféle növekedési faktorokkal, sőt akár GnRH analógokkal is [195]. Ezek alapján arra a következtetésre jutottam, hogy megbízhatóbb predikciót fluoreszcensen jelölt GnRH analógok alkalmazásával lehetne elérni *in vitro*. A fluorofór csoport pontos detektálhatósága miatt közvetlenül a daganatsejtek által felvett GnRH mennyiségét lehet mérni, ezáltal modellezhető egy konjugált daganatellenes hatóanyag transzportja is. Másrészt a radioaktív jelzéshez képest a fluoreszcens jelölés néhány előnyösebb tulajdonsággal rendelkezik, ennek köszönhetően igen elterjedt módszer napjainkban. A detektáláshoz alkalmazható széles körű technológiai háttér mellett, fontos a könnyű és biztonságos kezelhetőség, illetve az eltérő hullámhosszon detektálható fluorofórok egyidejű vizsgálata.

Meglepő módon azonban fluoreszcensen jelölt GnRH analógokról szinte egyáltalán nem találtam szakirodalmi adatot. Ezt a hiányt részben kompenzálja, hogy a daganatellenes antraciklin származékok GnRH konjugátumai is fluoreszcensen detektálhatók [163]. Esetükben azonban az erős sejttotoxicitás a diagnosztikai irányultságú kísérletek során hátrányos is lehet. Ezen megfontolásból három hatóanyag-hordozóként alkalmazható GnRH analóg FITC jelölését tűztem ki célul.

6.1 FITC-jelölt GnRH analógok

A FITC kapcsolására a szakirodalomban leírt GnRH konjugátumokhoz hasonló módon a Lys és D-Lys aminosavak oldalláncán található aminocsoportot jelöltem ki. A FITC reaktív izotiocianát csoportja könnyedén reagál nukleofil funkciós csoportokkal. Az irányított kapcsolás érdekében, a különféle oldallánc-védőcsoportokkal ellátott peptid felépítését követően, a Lys és D-Lys oldallánc-védőcsoportját szelektíven el kell távolítani. A FITC így a peptidhez ekvimoláris mennyiségben kapcsolódik, és stabil tiokarbamid kötést létesít. Az előállított [D-Lys⁶(FITC)]-GnRH-I, [D-Lys⁶(FITC)]-GnRH-II és [Lys⁸(FITC)]-GnRH-III konjugátumoknak vizsgáltam több fizikai-kémiai paraméterét, hogy megbizonyosodjak arról, megfelelnek-e az *in vitro* kísérletek általános kritériumainak.

A FITC jelölés csökkenti a GnRH analógok oldhatóságát, de a konjugátumok is jól oldódnak foszfát-pufferben. A legalacsonyabb oldhatósággal a [D-Lys⁶(FITC)]-GnRH-II rendelkezik, ennek való tekintettel, kísérleteim során a konjugátumokat legfeljebb 40 µM koncentrációban alkalmaztam. A stabilitást sejtenyésző médiumban vizsgáltam, bomlástermék egyik FITC-GnRH konjugátum esetén sem mérhető. A permeabilitást

mesterséges membránon (PAMPA) és kutya vese epitél sejtekből növesztett sejtrétegen (MDCK) vizsgáltam. Mindkét módszer megerősítette, hogy a konjugátumok passzív diffúzióval nem képesek átjutni a sejtmembránon, mely a szelektív, GnRH-R közvetített transzportjuk egyik alapvető feltétele. A PAMPA mérés hitelességét igazolja, hogy a kontrollként alkalmazott koffein és fluoreszcein permeabilitása a szakirodalmi adatokkal korrelál [200]. A citotoxicitást NIH/3T3 egér fibroblaszt sejteken MTT teszttel mértem, a fluoreszcens konjugátumok még 40 μ M koncentrációban sem sejttoxikusak. Ez azért előnyös, mert ezáltal a FITC jelölés kevésbé befolyásolja a sejtek életképességét és működését, ellentétben a szintén fluoreszcens antraciklin-GnRH konjugátumokkal. Ennek köszönhetően még hosszabb kezeléseket követően is jól vizsgálható a sejtek által felvett FITC-GnRH mennyisége.

Miután meggyőződtem arról, hogy a FITC-GnRH konjugátumok jól detektálhatóak és megbízhatóan alkalmazhatóak, több sejtvonal bevonásával folytattam kísérleteimet. Négy a szakirodalomban leírt és gyakran alkalmazott GnRH-R expresszázó daganat-sejtvonalat választottam referenciaként. Ezek az LNCaP (prosztatarák) [92], MCF-7 (mellrák) [202], BxPC-3 (hasnyálmirigy-rák) [178] és HT-29 (vastagbél-rák) [202] sejtvonalak. Kijelöltem további hat GnRH-R expresszióra vonatkozóan irodalmi adattal nem rendelkező sejtvonalat is. Ezek a Detroit-562 (garatrák), EBC-1, H-1993 és H-2228 (tüdőrák), illetve MDCK (kutya vese epitél) és NIH/3T3 (egér fibroblaszt) sejtvonalak. A GnRH-R expressziót sejtlizátumból, hGnRH-I-R specifikus antitesttel, western blottal vizsgáltuk. Fontos kihangsúlyozni, hogy a lizátumok esetén a sejtekben található összes GnRH-I-R mennyiségét mértük. Ezzel a módszerrel mindegyik vizsgált humán daganat-sejtvonal esetén igazoltuk a GnRH-I-R jelenlétét. A GnRH-I-R kisebb intenzitással az egér fibroblaszt sejtekben is kimutatható, azonban hGnRH-I-R antitesttel a kutya vese epitél sejtekben nem találtam receptort. Mivel az alkalmazott hGnRH-I-R antitestről nincs információ, hogy felismeri-e a kutya sejtekben expresszáló GnRH receptorokat, ezért az MDCK sejtvonalat ennek tudatában, összehasonlításképp alkalmaztam további kísérleteim során.

A konfokális lézer pásztázó mikroszkóp (CLSM) kiválóan alkalmas fluoreszcens vegyületek detektálására, és sejt-szintű lokalizációjuk vizsgálatára. Az LNCaP, MCF-7, BxPC-3, HT-29, Detroit-562, EBC-1 és MDCK sejteken hGnRH-I-R specifikus antitesttel, immuncitokémiai módszerrel jelöltem a sejtfelszíni GnRH receptorokat. Annak érdekében, hogy kizárólag a membrán receptorokat vizsgáljam, a sejtek membránját nem permeabilizáltam. Az eredmények azt mutatják, hogy a különféle

daganatsejtek igen eltérő mennyiségű receptort tartalmaznak membránjukban. Ilyen jelentős eltéréseket sejtlizátumokból, western blot módszerrel vizsgálva nem tapasztaltunk. A legtöbb sejtfelszíni receptor az LNCaP prosztatarák és MCF-7 emlőráksejteken látható. Ez az eredmény korrelál azokkal a szakirodalmi adatokkal, melyek alapján a prosztatarákok és az emlőrákok a daganatellenes GnRH konjugátumok legígéretebb célpontjai közé tartoznak [137].

A fej-nyaki tumorokra vonatkozóan kizárólag egy 2002-ben megjelent publikációt találtam, ahol megemlítik, hogy ezek a daganatok is potenciális GnRH célpontok lehetnek. Ebben a közleményben a fokozott GnRH-R expressziót, a fej-nyaki tumorok többségére jellemző, magasabb EGFR expresszióval hozták összefüggésbe [120]. Humán garatrákok GnRH-R expressziójára vonatkozó konkrét szakirodalmi adatot nem találtam. Ezért érdekes eredmény, hogy a kutatómunkám során vizsgált Detroit-562 garatrák sejtek felszínén a GnRH-I-R fokozott mennyiségét tapasztaltam. A tüdőrákokra, mint fokozott GnRH-R expresszáló daganatokra csak a közelmúltban figyeltek fel [123]. A CLSM vizsgálat alapján az EBC-1 nem-kissejtes tüdőráksejtek szintén fokozott mennyiségű sejtfelszíni GnRH receptorral rendelkeznek.

Az általam előállított FITC-GnRH konjugátumokkal 10 μ M koncentrációban kezelt sejtek CLSM felvételein látható, hogy a humán daganatsejtek által felvett konjugátumok mennyisége korrelál a sejtfelszíni GnRH-I-R mennyiségével. A szabad fluoreszcinnel kezelt kontroll sejtekben a fluoreszcein jelenléte alig mérhető. Ez az eredmény összhangban van azzal, hogy a fluoreszcein rossz permeabilitása miatt szabad formájában nehezen jut be a sejtekbe. A hGnRH-I-R-t nem expresszáló MDCK, illetve a membránban receptort nem tartalmazó BxPC-3 sejtekben a FITC-GnRH konjugátumok kisebb mennyiségben találhatók. Egyértelműen látható, hogy a jó célpontként ismert LNCaP és MCF-7 sejtek, illetve az újonnan vizsgált Detroit-562 garatrák és EBC-1 tüdőrák sejtek egyaránt jelentős mennyiségű konjugátumot tartalmaznak.

A BxPC-3 sejtek lizátumából western blottal igazoltuk a fokozott hGnRH-I-R expressziót. Ezért meglepő eredmény, hogy ugyanazzal az antitesttel, de immuncitokémiai módszerrel a BxPC-3 sejtek membránjában hGnRH-I-R nem található. Annak érdekében, hogy ezt az ellentmondást feloldjam, permeabilizált BxPC-3 sejteken megismételtem az immuncitokémiai jelölést. A permeabilizált sejtek esetén sikerült igazolni, hogy a GnRH-I-R jelentős mennyiségben expresszálódik a BxPC-3 sejtekben, azonban esetükben a receptor fehérje nem helyeződik ki a membránba. Ezt a megfigyelést a BxPC-3 sejtekben mérhető FITC-GnRH konjugátumok szignifikánsan kisebb

menntisége is megerősíti. Ezek az eredmények alátámasztják azt a feltételezést, miszerint a GnRH-R expresszió vizsgálata önmagában nem nyújt elégedő információt arról, hogy egy daganat mennyire hatékonyan célozható GnRH analógokkal. Meglátásom szerint a GnRH-R membrán-transzlokációjának sejttípus-függő intenzitása, illetve szabályozása eredményezi a különböző ráksejtek által felvett FITC-GnRH konjugátumok mennyisége közötti eltéréseket. Ráadásul a GnRH-R anterográd transzportját feltehetően maguk a GnRH analógok is sejttípus-függő módon indukálják, ami hosszabb távon döntő módon befolyásolhatja a GnRH-R-célzott terápia eredményességét. Ennek ellenére továbbra is többnyire csak GnRH-R mRNS, illetve fehérje expresszió vizsgálat alapján kategorizálnak egyes tumortípusokat, mint potenciális GnRH célpontokat.

Precízen beállított protokoll segítségével sikerült egyidejűleg, három különböző hullámhossz tartományban detektálnom a megfestett sejtmagot, a FITC-GnRH konjugátumokat, valamint a sejtfelszíni GnRH receptorokat. Az EBC-1 tüdőráksejtek CLSM felvételén egyértelműen látszik, hogy a 10 μM [D-Lys⁶(FITC)]-GnRH-I kezelés után 1 órával a konjugátum lokalizációja már eltér a sejtfelszíni GnRH receptorokétól és legnagyobb mennyiségben a sejtmembránon belül található.

Több publikáció is leírta, hogy a GnRH receptorhoz kötődött ligandum a receptor-közvetített endocitózis következtében a lizoszómába kerül [157, 158]. Ezért lizoszóma festékekkel tettem detektálhatóvá az EBC-1 sejtek lizoszómáit. Az 1 μM [D-Lys⁶(FITC)]-GnRH-I kezelés után 3 órával készített CLSM felvétel meggyőző módon igazolja, hogy a FITC-GnRH konjugátumok legnagyobb mennyiségben a lizoszómában lokalizálódnak (18. ábra).

Annak érdekében, hogy kvantitatív eredményeket kapjak a különféle sejtvonalak által felvett konjugátumokról, illetve összehasonlítsam a három FITC jelölt GnRH analóg hatékonyságát, áramlási citométerrel mértem a kezelt sejteket. A kezeléseket 1 és 10 μM koncentrációban végeztem el, a sejteket 1 és 5 óráig inkubálva. Az eredmények kiértékelése során, az 5 órás kezelés után mérhető fluoreszcencia intenzitást, valamint az 1 és 5 órás kezelések között mérhető fluoreszcencia intenzitás növekedést vettem figyelembe. Ez utóbbi módszer előnye, hogy így a nem-specifikus sejtfelszíni kötődésből származó háttér jobban kiszűrhető, és a GnRH analógok sejtek által történő felvételének kinetikája látható.

10 μM FITC-GnRH koncentráció esetén, mindegyik sejtvonalban detektálható a konjugátumok jelenléte. A különböző sejtvonalak által felvett konjugátumok mennyisége a CLSM felvételeken látható fluoreszcencia intenzitással összhangban van. A

konjugátumok legintenzívebb bejutása a fokozott sejtfelszíni GnRH receptorral rendelkező LNCaP, MCF-7 és Detroit-562 sejtekben mérhető. Az FITC-GnRH konjugátumok hatékonysága közötti különbség nem jelentős.

1 μM FITC-GnRH koncentráció esetén a sejtvonalak közötti különbség fokozódik, és a sejtfelszíni GnRH-I-R mennyiségével még jobban korrelál. A konjugátumok legnagyobb mennyiségben továbbra is az LNCaP, MCF-7 és Detroit-562 sejtekben vannak jelen. Mivel sejtvonalanként eltérő, hogy melyik konjugátum a leghatékonyabb, ezért nem lehet általánosságban kijelenteni, hogy melyik GnRH analóg a legalkalmasabb hatóanyag-szállító ágens. A GnRH-III alkalmazását indokolja jelentősen kisebb endokrin mellékhatása [166], jobb oldhatósága, ráadásul több daganat-sejtvonal esetén is a legeredményesebb analógnak bizonyult. Feltűnő a GnRH-II kiugróan magas mennyisége az LNCaP sejtekben. Ez az eredmény korrelál azzal, hogy a GnRH-II-R sokat vitatott expresszióját [91] az LNCaP prosztatarák sejtekben a közelmúltban igazolták, ráadásul a GnRH-II-R nagyobb mennyiségben expresszálódik ezekben a sejtekben, mint a GnRH-I-R [92].

Az EBC-1, H-1993 és H-2228 tüdőrák sejtvonalak esetén, az 1 μM koncentrációban alkalmazott FITC-GnRH GnRH konjugátumok időfüggő dúsulása szintén jól mérhető. A tüdőrák sejtek által felvett konjugátumok mennyisége a szakirodalomban gyakran megtalálható és jó GnRH célpontként ismert HT-29 vastagbélrák sejtekhez hasonló [203]. A hGnRH-I-R-t nem expresszáló MDCK, valamint a membránban a receptort nem tartalmazó BxPC-3 sejtek esetén a konjugátumok 1 μM esetén már egyáltalán nem, vagy csak alig dúsulnak. Ez arra enged következtetni, hogy a GnRH analógok transzportja 1 μM esetén szelektív és GnRH-R-függő. 10 μM koncentráció felett azonban GnRH-R-független transzportmechanizmus szerepe is feltételezhető. Az ismeretlen transzport jelenlétével összefüggésbe hozható, hogy magasabb koncentrációk esetén, a CLSM felvételeken a konjugátumok a sejteken belül homogénebb eloszlást mutatnak és kevésbé korlátozódnak a lizoszómákra. Ez a megfigyelés a magasabb, csak több mikromólos koncentrációban hatásos daganatellenes GnRH konjugátumok esetén elgondolkodtató.

6.2 Crizotinib-GnRH konjugátumok

PhD kutatómunkám során a FITC-jelölt GnRH analógok mellett daganatellenes GnRH konjugátumok előállításával és vizsgálatával is foglalkoztam. A daganatok gyógyszeres terápiájának egyik legintenzívebben fejlődő ága napjainkban a jelátviteli

terápia. A molekuláris célpontok tirozin, vagy szerin/treonin kinázok melyek gátlására jelenleg antitesteket vagy kismolekulás vegyületeket alkalmaznak.

A kismolekulás kinázgátlók, bár nagyon hatékony daganatellenes vegyületek, azonban több kedvezőtlen tulajdonsággal is rendelkeznek [204]. Általános probléma, hogy a kinázgátlók többsége ATP-kötőzsebet ismer fel, ezért számos nem célpont-kinázt is gátolnak. Ez sok mellékhatást eredményez. A kinázgátlók a kemoterápiás hatóanyagokkal ellentétben nem általános gátlószer, ezért hatékonyságuk erősen sejttípus-függő. A másik jelentős probléma ebből ered, ugyanis a változékony és heterogén daganatsejt populáció, illetve az összetett jelátviteli utak a kinázgátlókkal szembeni rezisztencia gyors kialakulását, sőt akár a tumorelles hatás elmaradását is eredményezhetik. A rezisztencia elkerülésére ígéretes megoldás lehet a kombinációs terápia, ami több, eltérő molekuláris célponton ható gátlószer egyidejű alkalmazását jelenti. A kinázgátlók kombinált alkalmazásának egyelőre a jelátviteli hálózatok rendszerszintű ismertetének hiányosságai, és a bizonytalan gyógyszer-interakciók szabnak gátat. Meglátásom szerint, mind a monoterápiás mellékhatások csökkentése, mind pedig a kombinációs terápia biztonságának növelése miatt, komoly jelentősége van a kinázgátlók célzott bejuttatásának a daganatsejtekbe.

A crizotinib egy hatékony, klinikai engedéllyel rendelkező kismolekulás kinázgátló, mindazonáltal az említett kedvezőtlen tulajdonságok mindegyike jellemző rá. A crizotinib daganatsejt-célzott bejuttatását, GnRH-val, mint célspecifikus hatóanyag-szállító ágenssel próbáltam megvalósítani. A crizotinib-GnRH konjugátumok hatékonyságának az egyik alapvető feltétele, hogy az adott ráksejtek érzékenyek legyenek a crizotinibbel szemben. A másik, hogy membránjukban fokozott mennyiségű GnRH receptorral rendelkezzenek és ezt a szintet a kezelés alatt fenn is tudják tartani. A FITC-GnRH konjugátumok igazolták, hogy a vizsgált daganat-sejtvonalak a BxPC-3 hasnyálmirigyrák kivételével (LNCaP, MCF-7, HT-29, Detroit-562, EBC-1, H-1993 és H-2228), mind potenciális GnRH célpontok lehetnek. Ezért a crizotinib-GnRH konjugátumok vizsgálatára alkalmas sejtvonalat a crizotinib molekuláris célpontjai alapján választottam ki.

A crizotinib eredetileg c-Met-gátlónak lett kifejlesztve [66]. A crizotinib ismert molekuláris célpontjai az ALK, ROS1, c-Met és RON receptor tirozin kinázok. A crizotinib alkalmazása csak ALK és ROS1 pozitív NSCLC esetén engedélyezett, azonban figyelemreméltó, hogy egyelőre ez az egyetlen klinikai engedéllyel is rendelkező, hatékony c-Met-gátló [205]. A szelektív c-Met-gátlók klinikai alkalmazásának jelenleg

több akadálya van. Egyrészt, az esetek többségében nincs biztos predikció arra, hogy az adott daganat érzékenyen reagál-e a c-Met gátlására [57]. További gondot okoz, hogy a c-Met-gátlás az egészséges sejtekre nézve is toxikus [61]. Ez utóbbi problémára a c-Met-gátlók ráksejtekbe történő célzott bejuttatása lehet a megoldás. Mindezen akadályok ellenére a c-Met-gátlók intenzíven kutatott vegyületek, mert a c-Met rendellenes működése daganatokban gyakran kimutatható, melyhez invazív fenotípus, számos rezisztencia mechanizmus és igen rossz prognózis társul [60]. Ezen szempontokat figyelembe véve a crizotinib molekuláris célpontjai közül a c-Metre fókuszáltam és a konjugátumok vizsgálatára a *c-Met* gén amplifikált és ennek következtében a c-Met fehérjét overexpresszáló EBC-1 tüdőrák sejtvonalat jelöltem ki [206].

Az EBC-1 sejtvonal esetén a crizotinib nagyon hatásosnak bizonyult, a racém hatóanyag 28 nM IC₅₀ értékkel rendelkezik. Ez az eredmény egybevág az A549 sejtek c-Met foszforilációjának gátlása esetén szakirodalomban leírt 19 nM IC₅₀ értékkel [66]. Említésre érdemes, hogy az új és nagyon ígéretes GnRH célpontként azonosított Detroit-562 garatrák sejtek is fokozott c-Met expresszióval rendelkeznek, azonban esetükben a crizotinib mégis hatástalannak bizonyult (ezért ezeket a mérési eredményeket a disszertációm nem tartalmazza). A Detroit-562 esetében a rezisztencia oka a c-Met jelátvitelben érintett PI3K mutációja, ami kiváló példája annak, hogy a c-Met rendellenes működése önmagában nézve még nem biztos prediktív biomarker. Azonban a c-Met-gátlók ígéretes, kombinált alkalmazását bizonyítja, hogy a c-Met és PI3K együttes gátlása a Detroit-562 sejteken szinergista daganatellenes hatást eredményez [207].

Az ALK és c-Met fehérjékkel alkotott crizotinib-komplex egyedi szerkezetét figyelembe véve, a crizotinibnek az ATP-kötősebből kifelé álló piperidin gyűrűjét jelöltem ki konjugálásra. Összekötő egységnek a GnRH konjugátumok esetén gyakran alkalmazott glutársavat választottam [178, 208, 169]. Annak érdekében, hogy a glutársav-anhidrid csak a piperidin aminocsoportjával reagáljon, a piridin gyűrű 2-es pozíciójában található, fehérjekötődésben érintett aminocsoportját szelektíven védenem kellett. Ezért a crizotinib szakirodalomban leírt totálszintézisét [209] alternatív úton valósítottam meg, melynek eredménye a szelektíven Boc védett crizotinib (MJ25). A Boc védőcsoport előnye, hogy a kulcsintermedierek erélyesebb reakciókörülmények között lejátszódó Suzuki kapcsolása során nem bomlik, azonban az elkészült konjugátum gyantáról történő savas hasítása során távozik. Az MJ25 vegyületből a Boc védőcsoportok eltávolításával állítottam elő a crizotinibet. Szintén az MJ25 vegyületből kiindulva kaptam meg a glutársav összekötő egységgel ellátott MJ26 vegyületet. Az MJ26 egy Boc védett

aminosavhoz hasonló módon, a hagyományos peptidkémiai eljárásokkal kapcsolható a lizin oldallánácán található aminocsoportoz.

Az előállított [D-Lys⁶(crizotinib)]-GnRH-I konjugátum (röviden: crizotinib-GnRH-I) és a racém crizotinib *in vitro* rekombináns c-Met fehérjén nagyságrendileg azonos IC₅₀ értékkel rendelkeznek. Ez az eredmény igazolja azt a feltételezést, miszerint az ATP-kötőzsebből kifelé álló piperidin gyűrűn keresztül konjugált crizotinib a peptiddel együtt is képes gátolni az c-Met fehérjét. Ezért meglepő, hogy a c-Met overexpresszáló EBC-1 sejteken a crizotinib-GnRH-I IC₅₀ értéke három nagyságrenddel magasabb a racém crizotinibhez képest. A hatóanyagot nem tartalmazó D-Lys⁶-GnRH-I esetén nem tapasztaltuk az EBC-1 sejtek életképességének szignifikáns változását. A crizotinib-GnRH-I EBC-1 sejtvonalon mért magasabb IC₅₀ értékére magyarázatot adhat, hogy a konjugátum nem képes eljutni a sejtmembránban található c-Met fehérje ATP-kötőzsebéhez, illetve a konjugátumból crizotinib sem szabadul fel. Azt, hogy a crizotinib-GnRH-I is képes a GnRH receptoron keresztül bejutni az EBC-1 sejtekbe, a FITC-GnRH konjugátumok eredményei alapján, illetve a szakirodalmi példákkal igazolt glutársav-összekötő egység beépítése miatt feltételeztem. Ezt az utóbbi feltételezést a későbbiekben bizonyítottam.

A crizotinib-GnRH-I után hatékonyabb konjugátumok előállítását tűztem ki célként, melyek képesek a hatóanyag leadására, lehetőleg a célsejteken belül. Az újabb crizotinib-GnRH konjugátumok megtervezése során eleinte a crizotinib és az összekötő egység közötti bomlékonyabb észterkötés kialakítására törekedtem. Az észterkötés alkalmazásának ötletét a klinika II. illetve III. fázisba jutott és számos publikációval igazolt Zopterelin-doxorubicin példájából merítettem [210, 211, 124, 212]. Az észterkötés kialakításának lehetőségét alifás hidroxilcsoport tartalmazó crizotinib analógok előállításával terveztem meg. Ezzel az elképzeléssel szinte minden tekintetben megegyező példát mutat be egy 2016-ben megjelent publikáció. Ez az első olyan tudományos közlemény, melyben kinázgátlót, konkrétan hidroxilcsoporttal ellátott sunitinib analógokat, sikeresen konjugáltak D-Lys⁶-GnRH-I peptiddel [180].

A kitűzött cél megvalósítása érdekében négy, alifás hidroxilcsoportot tartalmazó racém crizotinib analógot állítottam elő. Az MJ40, MJ54, MJ55 és MJ67 vegyületek hatékonyságát az EBC-1 sejtvonalon hasonlítottam össze a racém crizotinibével. A leghatékonyabb analógnak a crizotinibhez hasonló IC₅₀ értékkel (27 nM) az MJ55 bizonyult, ezért a négy analóg közül ezt jelöltem ki GnRH konjugátum előállítására.

Az alifás észterkötés kialakítására alkalmas crizotinib analógok mellett egy ötödik, karboxil csoportot tartalmazó, ezáltal aromás (más néven fenolos) észterkötés kialakítására is felhasználható analógot állítottam elő. Ez a vegyület az MJ37 analóg, ami EBC-1 sejteken a crizotinibhez képest, több mint egy nagyságrenddel magasabb IC_{50} értékkel ($0,5 \mu M$) rendelkezik. Ennek ellenére az MJ37 analógot több szempontból is érdekesnek gondoltam. Egyrészt, mert ez a vegyület a már előállított crizotinib-GnRH-I konjugátumban is megtalálható szerkezeti egység. Másrészt a glutársav kötődése miatt a piperidin bázikus karaktere megszűnik és egy gyengén savas karakterű karboxilcsoport jelenik meg ennél az analógnál. Ez a szerkezeti módosítás a savasabb karakter és megváltozott permeabilitás miatt érdekes.

A karbamát, vagy más néven uretán kötés stabilitása a kötésben résztvevő vegyületek szerkezetétől függően széles skálán mozog [213]. Ezért jelentőségük a modern hatóanyagok és biodegradábilis hatóanyag hordozó rendszerek fejlesztésében kimagasló [214, 215]. Ezt figyelembe véve karbamát kötést tartalmazó crizotinib-GnRH konjugátumok előállításával is próbálkoztam. Sajnos ezen szintézisek többsége nem járt sikerrel, ennek okait disszertációmban terjedelmi okokból nem részletezem. Az MJ95 vegyület az egyetlen olyan crizotinib analóg, melynek szelektíven Boc védett változatát (MJ76) karbamát kötést tartalmazó GnRH konjugátum előállítására is sikeresen fel tudtam használni. Az MJ95 analóg EBC-1 sejteken, a crizotinibhez képest egy nagyságrenddel gyengébb, $0,3 \mu M$ körüli IC_{50} értékkel rendelkezik.

A GnRH konjugátumok előállítására kiválasztott MJ37, MJ55 és MJ95 vegyületeket a pontosabb karakterizálásuk érdekében további kísérletekben vizsgáltam. Stabilitás vizsgálattal igazoltam, hogy a crizotinib és a három analóg sejtenyésző médiumban stabil. Az oldhatóságot PBS-ben mértem. A crizotinib esetén mért $14 \mu M$ -os oldhatóság a Cell Signaling Technology® honlapján feltüntetett $10-20 \mu M$ közötti értékkel korrelál (<https://media.cellsignal.com/pdf/4401.pdf>). Az MJ55 oldhatósága a crizotinibhez hasonló, az MJ37 analógé $100 \mu M$ körüli, az MJ95 oldhatósága pedig $1 \mu M$ alatti. A rossz oldhatóság miatt az MJ95 vegyületet, mint szabad hatóanyagot a továbbiakban nem vizsgáltam.

A crizotinib, MJ37 és MJ55 permeabilitását $4,8$ és $8,5$ közötti pH-tartományban mértem. A bázikus karakterű crizotinib permeabilitása lúgosabb tartományban fokozódik, azonban fiziológias pH-n alacsonynak mondható permeabilitása már enyhén savas pH-n is gyakorlatilag megszűnik. A permeabilitás pH-függő változását a crizotinibben található piperidin gyűrű $9,4$ pKa és az aminopiridin gyűrű $6,4$ pKa értéke magyarázza [216]. A

crizotinibhez szerkezetileg nagyon hasonló MJ55 analóg esetén a permeabilitás változása szintén a crizotinibhez hasonló. A karboxilcsoportot tartalmazó MJ37 analóg permeabilitása azonban a teljes vizsgált pH-tományban nagyon alacsony.

Előállítottam a crizotinib, MJ37 és MJ55 enantiomer-tiszta (R)-izomerét is. Az (R)-crizotinib és az (R)-MJ55 EBC-1 sejtvonalon egyaránt 8 nM körüli IC_{50} értékkel rendelkezik. A sejtek életképességének mérésre alkalmazott CellTiter-Glo[®] módszer hitelességét igazolja, hogy az (R)-crizotinib szakirodalomban leírt IC_{50} értéke az EBC-1 sejtek életképességének gátlása esetén 5 nM [217]. Az A549 sejtek c-Met foszforilációjának gátlása esetén 8 nM [66]. Az (R)-MJ37 esetén meglepő módon magasabb IC_{50} értékét ($\sim 0,7 \mu M$) mértünk, mint a racém változata esetén, bár a különbség közöttük nem szignifikáns. A racém MJ37 kedvezőbb IC_{50} értékének számtalan oka lehet, például elképzelhető, hogy bizonyos „*off-target*” kinázok gátlása esetén, ezen vegyület (S)-izomerje a hatékonyabb, de a relatíve magas IC_{50} értéke miatt ennek feltárásával nem foglalkoztam.

Az *in vitro* rekombináns c-Met, ALK, ROS1 és RON kinázokon mért gátlás alapján a (R)-crizotinib és (R)-MJ55 között nincs szignifikáns különbség. A c-Met foszforilációjának gátlása esetén a (R)-crizotinib 26 nM, az (R)-MJ55 22 nM IC_{50} értékkel rendelkezik. Meglepő módon a c-Met overexpresszáló EBC-1 sejtvonalon két nagyságrenddel gyengébb (R)-MJ37, a három vegyület közül a leghatékonyabb c-Met-gátló, 7 nM IC_{50} értékkel. Erre az ellentmondásra az (R)-MJ37 nagyon alacsony permeabilitása adhat magyarázatot, ami a farmakokinetikai tulajdonságok jelentőségére hívja fel a figyelmet.

Az MJ37, MJ55 és MJ95 analógok vizsgálata során kapott eredmények alapján úgy ítélt meg, hogy a belőlük előállítható GnRH konjugátumok célzott hatóanyag-szállító rendszerként történő előzetes vizsgálatára a racém vegyületek is alkalmasak. Az MJ37 analógból állítottam elő az aromás észterkötést tartalmazó [D-Lys⁶(MJ37)]-GnRH-I konjugátumot (röviden: MJ37-GnRH-I). Az MJ55 analógot az alifás észterkötést tartalmazó [D-Lys⁶(MJ55)]-GnRH-I konjugátumhoz (röviden: MJ55-GnRH-I) használtam fel. A karbamát kötést tartalmazó MJ95 analóg pedig a [D-Lys⁶(MJ95)]-GnRH-I konjugátum (röviden: MJ95-GnRH-I) szintézisének intermediere. Az előállított konjugátumok közül EBC-1 sejtvonalon az MJ55-GnRH-I bizonyult a leghatékonyabbnak, ezért ennek ismeretében állítottam elő az enantiomer-tiszta (R)-MJ55 analógot tartalmazó [Lys⁸((R)-MJ55)]-GnRH-III konjugátumot (röviden: (R)-MJ55-GnRH-III).

A szakirodalomból ismert, GnRH-R által kiváltott ERK1/2 aktiváció vizsgálatával győződtem meg arról, hogy mind az öt előállított crizotinib-GnRH konjugátum kötődik a GnRH receptorokhoz [201]. A konjugátumokat az EBC-1 sejtvonalon mért életképesség gátló hatás alapján hasonlítottam össze. A leghatékonyabbnak 12 nM IC₅₀ értékkel az (R)-MJ55-GnRH-III bizonyult. Ezt követi az MJ55-GnRH-I közel egy nagyságrenddel gyengébb, 61 nM IC₅₀ értékkel. Az MJ55 analógot tartalmazó konjugátumoktól jelentősen lemaradva 4,5 µM IC₅₀ értékkel következik az MJ37-GnRH-I. A crizotinib-GnRH-I 5,5 µM IC₅₀ értékéhez képest is gyengébb, 10 µM feletti IC₅₀ értéket mutat az MJ95-GnRH-I.

Az (R)-MJ55-GnRH-III 12 nM IC₅₀ értéke alapján egy szabadalmaztatható és sikeresen alkalmazható célzott daganatellenes konjugátum lehet. Azonban tekintettel voltam arra, hogy az észterkötést tartalmazó konjugátumok esetében a hatóanyag már a célba jutás előtt is felszabadulhat, elveszítve a konjugálás nyújtotta előnyöket. Mint kiderült, az észterkötés labilitása döntő szerepet játszott abban, hogy a GnRH-alapú hatóanyag-szállító rendszerek irányadójaként elkönnyvelt, Zoptarelin-doxorubicin (AN-152) engedélyezése 2017-ben, klinika III fázisban megbukott. A számos biztató publikáció ellenére a Zopterelin-doxorubicin randomizált, előrehaladott stádiumú méhnyálkahártya-rákos betegcsoport esetén sem az átlagos túlélés, sem a kardiotoxikus mellékhatások tekintetében nem mutatott szignifikáns előnyt a szabad doxorubicinhez képest (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT01767155). Ez az esemény feltehetően komoly szemléletváltást okoz a további GnRH konjugátumok fejlesztésében. Ezzel összefüggésben *in vivo* állatkísérletek helyett további *in vitro* kísérletekkel vizsgáltam crizotinib-GnRH konjugátumaimat.

A konjugátumok egyik legkritikusabb paraméterét, a stabilitást sejtenyészti médiumban mértem. A kapott eredmények alapján a savamid kötést tartalmazó crizotinib-GnRH-I és a karbamát kötést tartalmazó MJ95-GnRH-I stabil, az észterkötést tartalmazó konjugátumok azonban gyorsan hidrolizálnak. Ezen konjugátumok esetén 24 óra után gyakorlatilag már csak szabad hatóanyag van jelen a kezelőszeres médiumban. A gyorsan felszabaduló hatóanyag egyértelmű magyarázatot ad az észterkötést tartalmazó konjugátumok 72 órás kezelés után mért hatékonyságára, de az nem állapítható meg, hogy ebben milyen szerepet játszik a GnRH-irányított hatóanyagtranszport, illetve a GnRH indukált jelátvitel. Azonban egyértelműen megállapítható, hogy az előállított konjugátumok közül egyik sem hatékonyabb, mint a benne található hatóanyag szabad

formájában. Továbbá a konjugált hatóanyagokkal létesített kötés növekvő stabilitásával a konjugátumok életképesség gátló hatása egyre jelentősebb mértékben csökken.

Annak érdekében, hogy a GnRH-irányított hatóanyagtranszport előnyéről meggyőződjek, a NIH/3T3 egér fibroblaszt sejtvonalon mértem a szabad crizotinib analógok és GnRH konjugátumaik életképesség gátló hatását. Az NIH/3T3 sejt gyakran alkalmazott *in vitro* modell a különféle vegyületek citotoxicitásának vizsgálatára [218]. Az eredmények alapján mind a konjugált, mind pedig a szabad hatóanyagok egyaránt jelentősen magasabb koncentrációban gátolják az NIH/3T3 sejtek életképességét az EBC-1 sejtekhez képest. A jobb összehasonlítás érdekében kiszámítottam NIH/3T3 és EBC-1 sejteken mért IC_{50} értékek hányadosát. Az így definiált „*in vitro* hatékonysági index” alapján a legjobb eredményt a (R)-MJ55-GnRH-III konjugátum és (R)-MJ55 analóg érte el, ezt követi a klinikumban alkalmazott (R)-crizotinib. Megállapítható, hogy az „*in vitro* hatékonysági index” a crizotinib analógok GnRH-konjugálása következtében jelentős mértékben nem nőtt. A crizotinibbel ellentétben a crizotinib-GnRH konjugátumok *per os* adagolása nem lehetséges és előállításuk is jóval költségesebb. Ezeket a szempontokat is figyelembe véve a GnRH-irányított hatóanyagtranszport előnyét a bemutatott *in vitro* kísérletekkel, egyértelműen nem sikerült igazolnom.

Az (R)-MJ55-GnRH-III konjugátumon belül, megpróbáltam a GnRH-III EBC-1 sejtekre gyakorolt hatását két oldalról is megvizsgálni: egyfelől, mint hatóanyag-szállító ágens, másfelől, mint GnRH-agonista peptid. Ennek érdekében összehasonlítottam a szabad (R)-MJ55 és GnRH-III 1:1 arányú kombinációját a szabad (R)-MJ55 analóg, a szabad GnRH-III és az (R)-MJ55-GnRH-III konjugátum hatásával. Megállapítható, hogy az (R)-MJ55 és GnRH-III kombinációja hatásosabb, mint az (R)-MJ55-GnRH-III konjugátum. Ez arra enged következtetni, hogy a GnRH-III irányított hatóanyagtranszport még a belőle gyorsan felszabaduló (R)-MJ55 hatóanyag ellenére is kimutatható módon csökkenti a hatást. Másfelől érdekes eredmény, hogy a kombináció még a szabad (R)-MJ55 hatóanyagnál is alacsonyabb IC_{50} értéket eredményezett, bár ezt a különbséget szignifikánsan nem sikerült kimutatni.

A CompuSyn szoftverrel elvégzett számítás alapján, az EBC-1 sejtek életképességének 50%-os gátlásakor, az GnRH-III és (R)-MJ55 1:1 arányú kombinációja esetén erős szinergizmus, a konjugációjuk esetén pedig mérsékelt antagonizmus tapasztalható. Mivel a CompuSyn statisztikai valószínűséget nem vesz figyelembe és az GraphPad által számított IC_{50} értékek (4,7 nM és 8,5 nM) közötti különbség sem szignifikáns, ezért csak feltételezni lehet, hogy a (R)-MJ55 c-Met-gátlása és a GnRH-III

indukált GnRH-R jelátvitel (például az EGFR jelátvitel gátlás miatt [142]) az EBC-1 sejtvonalon szinergizál. A szinergizmus bizonyítása, vagy kizárása további kutatómunkát igényel.

6.3 Lizoszóma-csapda-teória

A bemutatott eredmények alapján megállapítottam, hogy a GnRH-irányított hatóanyagtranszport előnye a crizotinib-GnRH konjugátumok esetén elmarad a várttól, a hatóanyag célzott bejuttatása ismeretlen problémába ütközik. Ezért újabb crizotinib-GnRH konjugátumok szintézise helyett az előállított konjugátumok transzportmechanizmusát tanulmányoztam. Említésre érdemes, hogy a GnRH-val konjugált crizotinib analógok sejten belüli lokalizációjának vizsgálatára a közelmúltban kifejlesztett hiperspektrum-stimulált Raman-hasításos mikroszkóp kiválóan alkalmas lehetett volna, azonban ilyen eszköz nem állt rendelkezésemre [34].

A szakirodalomból ismert, hogy a receptor-mediált endocitózis során a receptor-ligandum komplex a receptor internalizációját követően korai endoszómába kerül, ahol a pH csökkenés hatására a ligandum a receptorról disszociál, ezt követően a ligandum a késői endoszómából kialakuló lizoszómában degradálódik [219]. Mivel az eredményeink azt igazolták, hogy a GnRH konjugátumok nem membrán permeabilisek, ezért valószínűsíthető, hogy a hozzájuk kapcsolt hatóanyagok a peptidlánc degradációja nélkül sem az endoszómából, sem pedig a lizoszómából nem képesek passzív diffúzióval kijutni. A patkány májsejtek lizoszóma preparátumában elvégzett stabilitás vizsgálat igazolta, hogy a crizotinib-GnRH-I és MJ95-GnRH-I esetén lizoszómális enzimek hatására sem keletkezik szabad hatóanyag. A legkisebb metabolitok a hatóanyagot tartalmazó di- vagy tripeptidek. A hatóanyaghoz kapcsolódó aminosavak a membrán permeabilitást jelentős mértékben csökkentik.

Figyelembe véve, hogy a crizotinib-GnRH-I és MJ95-GnRH-I kötődnek a GnRH receptorhoz és képesek a c-Met gátlására, mindazonáltal az EBC-1 sejteken csak több mikromólos koncentrációban hatékonyak, levonható az a következtetés, hogy ezek a konjugátumok szubmikromólos koncentrációban alkalmazva, a 72 órás kezelés során nem jutnak el számottevő mennyiségben a c-Met receptor tirozin kináz ATP-kötőzsebéhez. Meglátásom szerint a GnRH konjugátumok korlátozott intracelluláris transzportja a lizoszómában történő csapdázódásukkal összefüggésbe hozható, melynek célzott terápiás jelentőségéről a szakirodalomban ezidáig nem tettek említést. A GnRH-R-célzott hatóanyagok lizoszómában történő dúsulását a FITC-jelölt GnRH konjugátumok is

megegerősítik, továbbá 10 μM körüli koncentráció esetén már GnRH-R-független, esetleg a lizoszómát is elkerülő intracelluláris transzport jelenlétét feltételezik. Ez az ismeretlen transzportfolyamat összefüggésben állhat a sejttenyésztő médiumban stabil crizotinib-GnRH-I és MJ95-GnRH-I konjugátumok 5-10 μM felett jelentkező hatásával is.

Egy további problémát vet fel az a régóta ismert tény, hogy a bázikus karakterű, úgynevezett lizoszomotróp vegyületek a lizoszómákban spontán dúsulnak. Bázikus kinázgátlók esetén is megfigyelték, hogy akár három nagyságdenddel magasabb koncentrációban lehetnek jelen a lizoszómákban a citoplazmához képest [34]. Ennek oka, hogy a bázikus vegyületek a sejtplazmához képest savasabb lizoszómákban fokozottabban ionizálódnak, membrán permeabilitásukat elveszítik, ezáltal csapdázódnak.

A lizoszóma pH-ja 4,5 és 5 közötti [220]. A crizotinib két protonálható aminocsoportot tartalmaz, a proton felvételével keletkező piperidinium kation pK_a értéke 9,4 a piridinium kationé pedig 5,6 [216]. A két aminocsoport közül a piperidin bázikus karakterének a kiiktatására van lehetőség, erre az MJ37 analóg és az MJ95 analóg is egy példa. Az MJ55 esetén a piperidin gyűrűben tercier amin található, ami továbbra is bázikus, pK_a értéke 8,6 körüli. Nagyobb gondot jelent azonban a crizotinib alapvázát alkotó és fehérjekötődésért felelős 2-aminopiridin struktúra. A belőle keletkező piridinium kation 5,6 pK_a értéke ugyanis éppen a lizoszóma és a sejtplazma pH értéke közé esik. A PAMPA vizsgálat kiválóan modellezte, hogy a 2-aminopiridin gyűrű ionizációja miatt, már a korai endoszómákra jellemző $\text{pH}=6$ esetén is, a crizotinib analógok permeabilitása nagyon lecsökken, az ennél még savasabb lizoszomális pH -n pedig gyakorlatilag megszűnik. Az MJ37 analóg esetén a piperidinium kation kiiktatása és karboxilcsoport bevitele (elképzeléssel ellentétben), még $\text{pH}=4,8$ esetén sem képes a permeabilitást érdemben növelni. A 2-aminopiridin alapváz szerkezetének módosítására a PhD kutatómunkám során alkalmazott analóg szintézis módszerével nem volt lehetőség.

Az észterkötést tartalmazó MJ37-GnRH-I, MJ55-GnRH-I, (R)-MJ55-GnRH-III konjugátumok esetén kimutattam, hogy a hatóanyag egy része még a GnRH receptorhoz történő kötődés előtt felszabadul. A szabaddá vált hatóanyagnak lehetősége van passzív transzporttal bejutni a sejtekbe és eljutni a célfehérjékhez. Ez a jelenség eredményezi a fiziológiás pH -n membrán permeábilis MJ55 analógot tartalmazó konjugátumok fokozottabb hatását. Az MJ37 analóg bizonyult a leghatékonyabb c-Met-gátlónak, de gyenge permeabilitása miatt az EBC-1 sejtvonalon kisebb életképesség gátló hatást mutatott. Az MJ37-GnRH-I konjugátum eredményei azt tükrözik, hogy az MJ37

permeabilitásából adódó problémáját a GnRH-R-célzott bejuttatás sem oldotta meg. Ebből arra lehet következtetni, hogy a sejtekbe juttatott MJ37 számára a gyenge permeabilitás továbbra is hátrányt jelent és sejten belüli diffúziója gátolt.

Másfelől, az észterkötés hidrolízise előtt a GnRH receptorhoz kötődő konjugátumok a receptor-mediált endocitózis következtében a lizoszómába kerülnek és degradációjuk során a korábban fel nem szabadult hatóanyagot is itt adják le. A PAMPA vizsgálat megerősítette, hogy a crizotinib analógok számára a savasabb lizoszóma membránja jelentős akadály lehet abban, hogy ezek a vegyületek eljussanak a receptor tirozin kinázok ATP-kötőzsebéhez. Az elmondottak alapján a crizotinib-GnRH konjugátumok esetén feltárt problémát „*lizoszóma-csapda-teóriaként*” nevesítettem.

Felmerül a kérdés, hogy a „*lizoszóma-csapda-teória*”, mennyire állt helyt a publikált GnRH konjugátumok eredményeivel összevetve. A legtöbbet vizsgált és publikált GnRH konjugátumok doxorubicint vagy daunorubicint tartalmaznak [79]. Ez a két szerkezetileg hasonló antraciklin származék egyaránt egy-egy ionizációra hajlamos, bázikus aminocsoportot tartalmaz. A doxorubicin esetén bizonyított, hogy permeabilitása a pH-ra kevésbé érzékeny, ugyanis kisebb mértékben még ionizált formában is permeábilis [221]. Ezért a doxorubicin számára a savasabb lizoszóma membránja is átjárható. Meglátásom szerint a doxorubicin ezen ritkán felemlgetett, előnyös tulajdonsága is hozzájárul ahhoz, hogy eredményes, célzott bejuttatásáról számos publikációt találni a szakirodalomban. A stabil oxim-kötést tartalmazó daunorubicin-GnRH konjugátumok esetén azonban MCF-7 és HT-29 sejtvonalon a daunomicin citosztatikus hatásának már jelentős csökkenését tapasztalták, amit az összekötő egység lizoszómális degradációjának hiánya okoz. A hatás csökkenését a konjugált daunorubicin kisebb DNS-kötődésével magyarázták, azonban alacsonyabb permeabilitásról és gátolt lizoszóma-effluxról nem tettek említést [172, 173].

A D-Lys⁶-GnRH-I-konjugált sunitinib analóg (SAN1GSC) esetén a GnRH-R-célzott bejuttatás előnyét egyértelműen igazolták *in vivo* [180]. A SAN1 esetében a sunitinib egyetlen ionizációra hajlamos aminocsoportját cserélték le észterkötés létesítésére alkalmas hidroxilcsoportra. A lizoszóma savasabb környezete ezért feltehetőleg nincs hátrányos hatással a SAN1 permeabilitására és a szabad hatóanyag passzív transzportját sem akadályozza. A Zoptarelin-doxorubicinhez klinikai kudarcából kiindulva azonban az észterkötés labilitása a SAN1GSC konjugátum esetén is további kérdéseket vet fel.

Az elmúlt évtizedekben számos daganatellenes hatóanyag GnRH-konjugálásával próbálkoztak, de a terápiás hatás gyakran elmaradt a várttól, amit az is bizonyít, hogy még egyetlen GnRH konjugátum sem kapott klinikai engedélyt. Az újabb kutatások már

a tumorsejtekben bomló, elsősorban lizoszómális enzimek hatására degradálódó összekötő egységek alkalmazását preferálják [218, 222], azonban arra vonatkozó utalást nem találtam, hogy egyes célzottan bejuttatott hatóanyagok (mint például a crizotinib analógok), esetén alapvető problémát okozhat, hogy szabad formájukban sem képesek kijutni a lizoszómából.

A „lizoszóma-csapda-teória” egyfelől magyarázatot adhat arra, hogy a crizotinib-GnRH konjugátumok stabilitásának növekedésével miért csökken az életképesség gátló hatás. Másfelől továbbra is nyitott kérdés, hogy kizárólag a GnRH receptorokon keresztül az idő függvényében konkrétan mennyi hatóanyagot lehet bejuttatni a célsejtekbe, illetve, hogy az így elérhető intracelluláris hatóanyagkoncentráció önmagában elegendő-e a farmakológiai hatás kialakulásához. Ezért egyértelműen nem tudtam megállapítani, hogy a „lizoszóma-csapda teóriában” leírtakon kívül, a sejtfelszíni GnRH-R limitált mennyisége milyen mértékben járul hozzá a GnRH-konjugált crizotinib analógok hatásának csökkenéséhez, illetve melyik korlátozó tényező a jelentősebb. További kérdést vet fel a lizoszómában rekedt hatóanyag sorsa, hogy idővel képes-e onnan kijutni és hosszabb távon daganatellenes hatást kiváltani. Ezekre a kérdésre a crizotinib-GnRH konjugátumok esetén alkalmazott, legfeljebb 72 óráig tartó *in vitro* kísérletek nem adtak egyértelmű választ.

Összességében elmondható, hogy a szintetikus GnRH analógok képesek hatóanyagot szelektíven bejuttatni a célsejtekbe, amit a kutatómunkám során előállított FITC-jelölt GnRH analógok eredményei is bizonyítanak. Megállapítottam, hogy a GnRH-R-célzott hatóanyagtranszport eredményességét a GnRH-R sejtvonalként eltérő intenzitású membrán-transzlokációja determinálja. Az előállított öt crizotinib-GnRH konjugátum vizsgálata rámutatott arra, hogy a GnRH-R-közvetített endocitózis során a lizoszóma jelentős akadályt jelenthet abban, hogy a GnRH-konjugált hatóanyagok eljussanak molekuláris célpontjaikhoz. A crizotinib-GnRH konjugátumok hatékonyságát és célzott terápiás relevanciáját a crizotinib 2-aminopiridin alapvázának lizoszomotróp karaktere tovább csökkenti. A GnRH konjugátumok magasabb koncentrációja esetén feltételezhető, hogy GnRH-R-független módon is bejutnak a sejtekbe, ami a lizoszóma elkerülését eredményezheti, de ez a mechanizmus a célzott terápiás előnyt is megkérdőjelezi. Az előállított konjugátumok közül az EBC-1 tüdőrák sejtvonalon a GnRH-III-mal konjugált (R)-MJ55 analóg bizonyult a leghatékonyabbnak. Az (R)-MJ55 analóg mind konjugált, mind pedig szabad formájában a klinikumban alkalmazott (R)-crizotinibhez hasonló eredményeket ért el *in vitro*.

7. Következtetések

PhD kutatómunkám során a GnRH-alapú célzott daganatterápia alkalmazásának lehetőségeit tanulmányoztam. Célkitűzéseim között szerepelt fluoreszcensen detektálható GnRH analógok előállítása és vizsgálata, továbbá a crizotinib daganatellenes hatásmechanizmusának és a GnRH-irányított hatóanyag-bejuttatás előnyének az ötvözése.

Az általam elsőként előállított FITC-GnRH konjugátumok eredményeivel kapcsolatos következtetésem az alábbiak:

1. A sejtek által felvett [D-Lys⁶(FITC)]-GnRH-I, [D-Lys⁶(FITC)]-GnRH-II és [Lys⁸(FITC)]-GnRH-III fluoreszcencia intenzitása idő- és koncentrációfüggő módon mérhető, a szelektív jelölés következtében mennyiségük egymással összehasonlítható. Fizikai-kémiai paramétereik alapján a FITC-GnRH konjugátumok *in vitro* kísérletekben megbízhatóan alkalmazhatók.
2. A GnRH-R expresszálo daganatsejtek igen eltérő mennyiségben helyezik ki a receptort a sejtmembránba. A GnRH-R anterográd transzportját feltehetően maguk a GnRH analógok is sejttípus-függő módon indukálják, ezért a GnRH-R expresszió vizsgálat önmagában nem biztos prediktív biomarkere az eredményes GnRH-R célzott terápiának. A FITC-GnRH konjugátumok előnye, hogy az esetenként félrevezető GnRH-R expresszió vizsgálata helyett, közvetlenül a sejtek által felvett GnRH analógok mennyisége mérhető és ez alapján lehet a GnRH-R-célzott terápia hatékonyságát prediktálni *in vitro*.
3. A Detroit-562 sejtvonal vizsgálata elsőként mutatott rá arra, hogy GnRH-alapú hatóanyag-szállító rendszerekkel egyes garatrákok is igen hatékonyan célozhatóak. A FITC-GnRH konjugátumok dúsulása az újonnan vizsgált EBC-1, H-1993 és H-2228 tüdőrák sejtekben szintén célzott terápiás jelentőséggel bír.
4. Alacsony koncentrációban alkalmazott FITC-GnRH konjugátumok esetén, a sejtek által felvett konjugátumok mennyisége szoros összefüggésben áll a sejtek membránjában található GnRH-I-R mennyiségével. Magasabb koncentrációk esetén feltételezhető, hogy GnRH-R-független, ismeretlen transzportmechanizmus is szerepet játszik a GnRH konjugátumok intracelluláris transzportjában.

Az általam elsőként előállított crizotinib analógok és a crizotinib-GnRH konjugátumok eredményeivel kapcsolatos következtetésem az alábbiak:

5. A szelektíven Boc-védett crizotinib analógok felhasználhatóak GnRH konjugátumok előállítására. Az (R)-MJ55 mind az ALK, ROS1, c-Met és RON kinázok gátlásában, mind pedig a daganatmodellként kiválasztott, *c-Met* amplifikált EBC-1 sejtek életképességének gátlásában a klinikumban alkalmazott crizotinibhez hasonló eredményeket ért el *in vitro*. Az (R)-MJ37 a crizotinibnél hatékonyabb c-Met-gátló, azonban gyengébb permeabilitása miatt az EBC-1 sejteken jelentősen kisebb hatással rendelkezik.
6. A crizotinib-GnRH konjugátumok hatékonyságát és szelektivitását a hatóanyag és összekötő egység között kialakított kémiai kötés döntő módon befolyásolja. A kevésbé hatékony crizotinib-GnRH-I és MJ95-GnRH-I konjugátumokban található savamid, illetve karbamát kötés stabil, ezért fiziológiás körülmények között belőlük szabad hatóanyag nem keletkezik. Az MJ37-GnRH-I, MJ55-GnRH-I és (R)-MJ55-GnRH-III konjugátumok esetén a hatóanyagokkal létesített észterkötés gyorsan hidrolizál. A GnRH-R-célzott bejutást megelőzően felszabaduló hatóanyagok fokozottabb hatást eredményeznek, de a célzott terápia előnyt is megkérdőjelezik.
7. A crizotinib-GnRH konjugátumok hatásmechanizmusában kulcsfontosságú tényező a GnRH-R-mediált endocitózissal járó hatóanyagtranszport a lizoszómába. A crizotinib fehérjekötődésben érintett 2-aminopiridin alapvázának lizoszomotróp jellege miatt, a permeabilitást csökkentő ionizáció elkerülhetetlen a lizoszómában. Ezért feltételezhető, hogy a GnRH receptoron keresztül bejutatott crizotinib analógok nehezebben jutnak el a receptor tirozin kinázok ATP-kötőzsebéhez. A feltárt problémát „lizoszóma-csapda-teóriaként” nevesítettem.
8. Eredményesebb GnRH konjugátumok előállításához a célsejteken belül felszabaduló és lizoszóma-effluxra képes hatóanyagokra van szükség. Ha a hatóanyag kémiai szerkezete ezt nem teszi lehetővé, akkor a GnRH-hoz lizoszómális enzimek hatására felhasadó kötással kapcsolt membrán-penetráló egység, majd a penetráló egységhez stabil kötással kapcsolt hatóanyag lehet egy alternatív megoldás. A daganatsejtek membránjában található GnRH-R csekély mennyisége miatt a szelektíven bejuttatható hatóanyag korlátozott mennyiségét is számításba kell venni.

8. Összefoglalás

PhD kutatómunkám során a GnRH-alapú célzott daganatterápia alkalmazásának lehetőségeit tanulmányoztam. Kiemelten fókuszáltam a különféle tumorsejt-típusok által felvehető GnRH konjugátumok mennyiségére, a célzott terápiás hatékonyság predikciójára. A kitűzött cél érdekében terveztem meg és állítottam elő a D-Lys⁶-GnRH-I, D-Lys⁶-GnRH-II, és GnRH-III analógok FITC-jelölt konjugátumait.

A FITC-GnRH konjugátumok jól detektálhatók, mennyiségük kvantitív módon mérhető és *in vitro* kísérletekben megbízhatóan alkalmazhatók. A Detroit-562 sejtek által felvett konjugátumok mennyisége elsőként mutatott rá arra, hogy GnRH-alapú hatóanyag-szállító rendszerekkel egyes garatrakok is igen hatékonyan célozhatóak. A konjugátumok dúsulása az EBC-1, H-1993 és H-2228 tüdőrák sejtekben szintén célzott terápiás jelentőséggel bír. Alacsonyabb koncentráció esetén a célsejtekbe bejutó FITC-GnRH konjugátumok mennyiségét a GnRH-R sejttípusonként eltérő intenzitású membrán-transzlokációja determinálja. Magasabb koncentrációk esetén azonban az eredmények GnRH-I-R-független transzport jelenlétére utalnak.

PhD kutatómunkám célkitűzési között szerepelt a klinikumban alkalmazott crizotinib hatásmechanizmusának és a GnRH-R-célzott daganatterápia előnyeinek az ötvözése. A különféle konjugálási lehetőségek érdekében szelektíven védett crizotinib analógokat állítottam elő. A crizotinib analógok felhasználásával öt GnRH konjugátumot állítottam elő, melyekben a hatóanyag kapcsolására savamid, észter, vagy karbamát kötést alkalmaztam. Ezek a kötéstípusok meghatározó módon befolyásolják a konjugátumok stabilitását és hatékonyságát. Az észterkötést tartalmazó konjugátumok esetén a hatóanyag egy része már a célbajutás előtt felszabadul, ami szelektivitást csökkenti. A stabil savamid és karbamát kötést tartalmazó konjugátum esetén a hatás csökken jelentős mértékben.

A GnRH-R-mediált endocitózis következtében a GnRH konjugátumok lizoszómába kerülnek. A crizotinib lizoszomotróp alapváza miatt, a célzottan bejuttatott analógok a szabad analógoknál nehezebben képesek eljutni a receptor tirozin kinázok ATP-kötőzsebéhez. Ezzel összefüggésben, a crizotinib-GnRH konjugátumok esetén a GnRH-irányított hatóanyag-bejuttatás előnyét egyértelműen nem sikerült kimutatnom *in vitro*. Az általam előállított (R)-MJ55 analóg azonban szabad és GnRH-III konjugált formájában egyaránt a crizotinibhez hasonló eredményeket ért el a *c-Met* amplifikált EBC-1 tüdőrák sejtvonalon *in vitro*.

9. Summary

The aim of my doctoral thesis was to investigate the therapeutic possibilities of the GnRH-based drug delivery systems. I focused on the uptake of the GnRH conjugates by different types of cancer cells, and on the prediction of the GnRH-targeted therapeutic efficiency using *in vitro* cancer cell models. For this purpose I designed and synthesized FITC-labeled conjugates of D-Lys⁶-GnRH-I, D-Lys⁶-GnRH-II, and GnRH-III analogues.

FITC-GnRH conjugates are easily detectable, their amounts are quantifiable, and their appliance is reliably *in vitro*. The amount of these conjugates detected in Detroit-562 cells revealed for the first time that certain pharynx cancers may be efficiently targeted by GnRH-based drug delivery systems. The enrichment of these conjugates in EBC-1, H-1993 és H-2228 lung cancer cells assume therapeutic significance, as well. At lower concentrations the amount of conjugates in the targeted cells are determined by the cell type-depenedent regulation of GnRH-R translocation into the plasma membrane. Higher FITC-GnRH concentrations suggest the presence of GnRH-R independent uptake mechanisms.

In my PhD research I attempted to combine the mechanism of action of the clinically applied crizotinib and the cancer therapeutic advantages of GnRH-targeted drug delivery. To extend the conjugating possibilities of crizotinib I synthesized various selectively protected crizotinib analogues. Using these novel compounds I synthesized five anticancer GnRH conjugates, containing ester, amide, or carbamate bond to attach the crizotinib analogues. The type of the chemical bond determines the stability and the selectivity of these conjugates fundamentally. Ester bond containing conjugates could release the compounds before they reach the GnRH-R, which reduces their selectivity. On the other hand the more stable amide and carbamate bond containing conjugates resulted in much lower effect.

GnRH conjugates are delivered into the lysosomes via GnRH-R-mediated endocytosis. The GnRH-targeted crizotinib analouges are much more difficult to reach the ATP-binding site of receptor tyrosine kinases than the free analogues due to the lysosomotropic core of crizotinib. Therefore in case of crizotinib-GnRH conjugates I can not obviously demonstrate the advantage of GnRH-targeted drug delivery *in vitro*. Nevertheless, both of the conjugated and the unconjugated (R)-MJ55 crizotinib analogue resulted in similar efficiency on the *c-Met* amplificated EBC-1 cell line *in vitro* as the clinically applied crizotinib.

10. Irodalomjegyzék:

- [1] Fitzmaurice C, Allen C, Barber RM, Barregard L, Bhutta ZA, Brenner H, Dicker DJ, Chimed-Orchir O, Dandona R, Dandona L, Fleming T, Forouzanfar MH, Hancock J, Hay RJ, Hunter-Merrill R, Huynh C, Hosgood HD, Johnson CO, Jonas JB, Khubchandani J, Kumar GA, Kutz M, Lan Q, Larson HJ, Liang X, Lim SS, Lopez AD, MacIntyre MF, Marczak L, Marquez N, Mokdad AH, Pinho C, Pourmalek F, Salomon JA, Sanabria JR, Sandar L, Sartorius B, Schwartz SM, Shackelford KA, Shibuya K, Stanaway J, Steiner C, Sun J, Takahashi K, Vollset SE, Vos T, Wagner JA, Wang H, Westerman R, Zeeb H, Zoeckler L, Abd-Allah F, Ahmed MB, Alabed S, Alam NK, Aldhahri SF, Alem G, Alemayohu MA, Ali R, Al-Raddadi R, Amare A, Amoako Y, Artaman A, Asayesh H, Atnafu N, Awasthi A, Saleem HB, Barac A, Bedi N, Bensenor I, Berhane A, Bernabé E, Betsu B, Binagwaho A, Boneya D, Campos-Nonato I, Castañeda-Orjuela C, Catalá-López F, Chiang P, Chibueze C, Chitheer A, Choi JY, Cowie B, Damtew S, Das Neves J, Dey S, Dharmaratne S, Dhillon P, Ding E, Driscoll T, Ekwueme D, Endries AY, Farvid M, Farzadfar F, Fernandes J, Fischer F, Ghiwot TT, Gebru A, Gopalani S, Hailu A, Horino M, Horita N, Hussein A, Huybrechts I, Inoue M, Islami F, Jakovljevic M, James S, Javanbakht M, Jee SH, Kasaeian A, Kedir MS, Khader YS, Khang YH, Kim D, Leigh J, Linn S, Lunevicius R, El Razek HMA, Malekzadeh R, Malta DC, Marcenes W, Markos D, Melaku YA, Meles KG, Mendoza W, Mengiste DT, Meretoja TJ, Miller TR, Mohammad KA, Mohammadi A, Mohammed S, Moradi-Lakeh M, Nagel G, Nand D, Le Nguyen Q, Nolte S, Ogbo FA, Oladimeji KE, Oren E, Pa M, Park EK, Pereira DM, Plass D, Qorbani M, Radfar A, Rafay A, Rahman M, Rana SM, Søreide K, Satpathy M, Sawhney M, Sepanlou SG, Shaikh MA, She J, Shiue I, Shore HR, Shrimé MG, So S, Soneji S, Stathopoulou V, Stroumpoulis K, Sufiyan MB, Sykes BL, Tabarés-Seisdedos R, Tadese F, Tedla BA, Tessema GA, Thakur JS, Tran BX, Ukwaja KN, Chudi Uzochukwu BS, Vlassov VV, Weiderpass E, Wubshet Terefe M, Yebo HG, Yimam HH, Yonemoto N, Younis MZ, Yu C, Zaidi Z, Zaki MES, Zenebe ZM, Murray CJL, Naghavi M. (2017) Global, regional, and national cancer incidence, mortality, years of life lost, years lived with disability, and disability-adjusted life-years for 32 cancer groups, 1990 to 2015: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study Global Burden of Disease Cancer Collaboration. *JAMA Oncol*, 3: 524-548.
- [2] Vogelstein B, Papadopoulos N, Velculescu VE, Zhou S, Diaz LA, Jr., Kinzler KW. (2013) Cancer genome landscapes. *Science*, 339: 1546-1558.

- [3] Hanahan D, Weinberg RA. (2011) Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*, 144: 646-674.
- [4] Griffin AM, Butow PN, Coates AS, Childs AM, Ellis PM, Dunn SM, Tattersall MHN. (1996) On the receiving end V: Patient perceptions of the side effects of cancer chemotherapy in 1993. *Ann Oncol*, 7: 189-195.
- [5] Hojjat-Farsangi M. (2014) Small-molecule inhibitors of the receptor tyrosine kinases: Promising tools for targeted cancer therapies. *Int J Mol Sci*, 15: 13768-13801.
- [6] Levitzki A. (1994) Signal-Transduction Therapy: A Novel Approach to Disease Management. *Eur J Biochem*, 226: 1-13.
- [7] Smith AD, Roda D, Yap TA. (2014) Strategies for modern biomarker and drug development in oncology. *J Hematol Oncol*, 7: 70.
- [8] Swanton C. (2012) Intratumor heterogeneity: Evolution through space and time. *Cancer Res*, 72: 4875-4882.
- [9] Dean M, Fojo T, Bates S. (2005) Tumour stem cells and drug resistance. *Nat Rev Cancer*, 5: 275-284.
- [10] Holohan C, Van Schaeybroeck S, Longley DB, Johnston PG. (2013) Cancer drug resistance: An evolving paradigm. *Nat Rev Cancer*, 13: 714-726.
- [11] Levitzki A, Klein S. (2010) Signal transduction therapy of cancer. *Mol Aspects Med*, 31: 287-329.
- [12] Gross S, Rahal R, Stransky N, Lengauer C, Hoeflich KP. (2015) Targeting cancer with kinase inhibitors. *J Clin Invest*, 125: 1780-1789.
- [13] Chan BA, Hughes BGM. (2015) Targeted therapy for non-small cell lung cancer: current standards and the promise of the future. *Transl Lung Cancer Res*, 4: 36-54.
- [14] Shah DR, Shah RR, Morganroth J. (2013) Tyrosine kinase inhibitors: Their on-target toxicities as potential indicators of efficacy. *Drug Safety*, 36: 413-426.
- [15] Gay C, Toulet D, Le Corre P. (2017) Pharmacokinetic drug-drug interactions of tyrosine kinase inhibitors: A focus on cytochrome P450, transporters, and acid suppression therapy. *Hematol Oncol*, 35: 259-280.
- [16] Csermely P, Korcsmáros T, Kiss HJM, London G, Nussinov R. (2013) Structure and dynamics of molecular networks: A novel paradigm of drug discovery: A comprehensive review. *Pharmacol Ther*, 138: 333-408.
- [17] Ding H, Wu F. (2012) Image guided biodistribution of drugs and drug delivery. *Theranostics*, 2: 1037-1039.

- [18] Cohen P. (2002) Protein kinases - The major drug targets of the twenty-first century? *Nat Rev Drug Discov*, 1: 309-315.
- [19] Manning G, Whyte DB, Martinez R, Hunter T, Sudarsanam S. (2002) The protein kinase complement of the human genome. *Science*, 298: 1912-1934.
- [20] Roskoski R, Jr. (2016) Classification of small molecule protein kinase inhibitors based upon the structures of their drug-enzyme complexes. *Pharmacol Res*, 103: 26-48.
- [21] Blume-Jensen P, Hunter T. (2001) Oncogenic kinase signalling. *Nature*, 411: 355-365.
- [22] Hanks SK, Quinn AM, Hunter T. (1988) The protein kinase family: Conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains. *Science*, 241: 42-52.
- [23] Sawa M. (2008) Strategies for the design of selective protein kinase inhibitors. *Mini Rev Med Chem*, 8: 1291-1297.
- [24] Lawrence DS, Niu J. (1998) Protein kinase inhibitors: The tyrosine-specific protein kinases. *Pharmacol Ther*, 77: 81-114.
- [25] Urich R, Wishart G, Kiczun M, Richters A, Tidten-Luksch N, Rauh D, Sherborne B, Wyatt PG, Brenk R. (2013) De Novo design of protein kinase inhibitors by in silico identification of hinge region-binding fragments. *ACS Chem Biol*, 8: 1044-1052.
- [26] Zhang J, Yang PL, Gray NS. (2009) Targeting cancer with small molecule kinase inhibitors. *Nat Rev Cancer*, 9: 28-39.
- [27] O'Brien Z, Moghaddam MF. (2013) Small molecule kinase inhibitors approved by the FDA from 2000 to 2011: A systematic review of preclinical ADME data. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*, 9: 1597-1612.
- [28] Kamb A, Wee S, Lengauer C. (2007) Why is cancer drug discovery so difficult? *Nat Rev Drug Discov*, 6: 115-120.
- [29] <http://www.brimr.org/PKI/PKIs.htm>
- [30] Shoshan MC, Linder S. (2008) Target specificity and off-target effects as determinants of cancer drug efficacy. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*, 4: 273-280.
- [31] Zhou Y, Zhao C, Gery S, Braunstein GD, Okamoto R, Alvarez R, Miles SA, Doan NB, Said JW, Gu J, Phillip Koeffler H. (2014) Off-target effects of c-MET inhibitors on thyroid cancer cells. *Mol Cancer Ther*, 13: 134-143.
- [32] Fabbro D. (2015) 25 Years of small molecular weight kinase inhibitors: Potentials and limitations. *Mol Pharmacol*, 87: 766-775.

- [33] Ndolo RA, Luan Y, Duan S, Forrest ML, Krise JP. (2012) Lysosomotropic Properties of Weakly Basic Anticancer Agents Promote Cancer Cell Selectivity In Vitro. *PLoS ONE*, 7: e49366.
- [34] Fu D, Zhou J, Zhu WS, Manley PW, Wang YK, Hood T, Wylie A, Xie XS. (2014) Imaging the intracellular distribution of tyrosine kinase inhibitors in living cells with quantitative hyperspectral stimulated Raman scattering. *Nat Chem*, 6: 614-622.
- [35] Torre LA, Siegel RL, Jemal A. (2016) Lung Cancer Statistics. *Adv Exp Med Biol*, 893: 1-19.
- [36] Herbst RS, Heymach JV, Lippman SM. (2008) Molecular origins of cancer: Lung cancer. *N Engl J Med*, 359: 1367-1380.
- [37] Gandhi S, Chen H, Zhao Y, Dy GK. (2015) First-line treatment of advanced ALK-positive non-small-cell lung cancer. *Lung Cancer*, 6: 71-82.
- [38] Kazandjian D, Blumenthal GM, Chen HY, He K, Patel M, Justice R, Keegan P, Pazdur R. (2014) FDA approval summary: crizotinib for the treatment of metastatic non-small cell lung cancer with anaplastic lymphoma kinase rearrangements. *Oncologist*, 19: e5-11.
- [39] <https://www.fda.gov/newsevents/newsroom/pressannouncements/ucm490329.htm>
- [40] Stoica GE, Kuo A, Aigner A, Sunitha I, Souttou B, Malerczyk C, Caughey DJ, Wen D, Karavanov A, Riegel AT, Wellstein A. (2001) Identification of Anaplastic Lymphoma Kinase as a Receptor for the Growth Factor Pleiotrophin. *J Biol Chem*, 276: 16772-16779.
- [41] Stoica GE, Kuo A, Powers C, Bowden ET, Sale EB, Riegel AT, Wellstein A. (2002) Midkine binds to anaplastic lymphoma kinase (ALK) and acts as a growth factor for different cell types. *J Biol Chem*, 277: 35990-35998.
- [42] Murray PB, Lax I, Reshetnyak A, Ligon GF, Lillquist JS, Natoli EJ, Jr., Shi X, Folta-Stogniew E, Gunel M, Alvarado D, Schlessinger J. (2015) Heparin is an activating ligand of the orphan receptor tyrosine kinase ALK. *Sci Signal*, 8: ra6.
- [43] Bilsland JG, Wheeldon A, Mead A, Znamenskiy P, Almond S, Waters KA, Thakur M, Beaumont V, Bonnert TP, Heavens R, Whiting P, McAllister G, Munoz-Sanjuan I. (2008) Behavioral and neurochemical alterations in mice deficient in anaplastic lymphoma kinase suggest therapeutic potential for psychiatric indications. *Neuropsychopharmacology*, 33: 685-700.
- [44] Bresler SC, Weiser DA, Huwe PJ, Park JH, Krytska K, Ryles H, Laudenslager M, Rappaport EF, Wood AC, McGrady PW, Hogarty MD, London WB, Radhakrishnan R,

Lemmon MA, Mossé YP. (2014) ALK Mutations Confer Differential Oncogenic Activation and Sensitivity to ALK Inhibition Therapy in Neuroblastoma. *Cancer Cell*, 26: 682-694.

[45] Katayama R, Lovly CM, Shaw AT. (2015) Therapeutic targeting of anaplastic lymphoma kinase in lung cancer: A paradigm for precision cancer medicine. *Clin Cancer Res*, 21: 2227-2235.

[46] Gainor JF, Varghese AM, Ou SH, Kabraji S, Awad MM, Katayama R, Pawlak A, Mino-Kenudson M, Yeap BY, Riely GJ, Iafrate AJ, Arcila ME, Ladanyi M, Engelman JA, Dias-Santagata D, Shaw AT. (2013) ALK rearrangements are mutually exclusive with mutations in EGFR or KRAS: an analysis of 1,683 patients with non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res*, 19: 4273-4281.

[47] Shaw AT, Kim DW, Nakagawa K, Seto T, Crinó L, Ahn MJ, De Pas T, Besse B, Solomon BJ, Blackhall F, Wu YL, Thomas M, O'Byrne KJ, Moro-Sibilot D, Camidge DR, Mok T, Hirsh V, Riely GJ, Iyer S, Tassell V, Polli A, Wilner KD, Jänne PA. (2013) Crizotinib versus chemotherapy in advanced ALK-positive lung cancer. *N Engl J Med*, 368: 2385-2394.

[48] Rimkunas VM, Crosby KE, Li D, Hu Y, Kelly ME, Gu TL, Mack JS, Silver MR, Zhou X, Haack H. (2012) Analysis of receptor tyrosine kinase ROS1-positive tumors in non-small cell lung cancer: Identification of a FIG-ROS1 fusion. *Clin Cancer Res*, 18: 4449-4457.

[49] Uguen A, De Braekeleer M. (2016) ROS1 fusions in cancer: A review. *Future Oncol*, 12: 1911-1928.

[50] Davies KD, Doebele RC. (2013) Molecular pathways: ROS1 fusion proteins in cancer. *Clin Cancer Res*, 19: 4040-4045.

[51] Lee HJ, Seol HS, Kim JY, Chun SM, Suh YA, Park YS, Kim SW, Choi CM, Park SI, Kim DK, Kim YH, Jang SJ. (2013) ROS1 receptor tyrosine kinase, a druggable target, is frequently overexpressed in non-small cell lung carcinomas via genetic and epigenetic mechanisms. *Ann Surg Oncol*, 20: 200-208.

[52] Bergethon K, Shaw AT, Ou SHI, Katayama R, Lovly CM, McDonald NT, Massion PP, Siwak-Tapp C, Gonzalez A, Fang R, Mark EJ, Batten JM, Chen H, Wilner KD, Kwak EL, Clark JW, Carbone DP, Ji H, Engelman JA, Mino-Kenudson M, Pao W, Iafrate AJ. (2012) ROS1 rearrangements define a unique molecular class of lung cancers. *J Clin Oncol*, 30: 863-870.

- [53] Gherardi E, Birchmeier W, Birchmeier C, Woude GV. (2012) Targeting MET in cancer: Rationale and progress. *Nat Rev Cancer*, 12: 89-103.
- [54] Organ SL, Tsao M-S. (2011) An overview of the c-MET signaling pathway. *Ther Adv Med Oncol*, 3: S7-S19.
- [55] Peters S, Adjei AA. (2012) MET: A promising anticancer therapeutic target. *Nat Rev Clin Oncol*, 9: 314-326.
- [56] Hughes VS, Siemann DW. (2018) Have Clinical Trials Properly Assessed c-Met Inhibitors? *Trends Cancer*, 4: 94-97.
- [57] Pilotto S, Carbognin L, Karachaliou N, Ma PC, Rosell R, Tortora G, Bria E. (2017) Tracking MET de-addiction in lung cancer: A road towards the oncogenic target. *Cancer Treat Rev*, 60: 1-11.
- [58] Viticchie G, Muller PAJ. (2015) c-Met and Other Cell Surface Molecules: Interaction, Activation and Functional Consequences. *Biomedicines*, 3: 46-70.
- [59] Yi YW, You K, Jeongbae E, Kwak SJ, Seong YS, Bae I. (2015) Dual inhibition of EGFR and MET induces synthetic lethality in triple-negative breast cancer cells through downregulation of ribosomal protein S6. *Int J Oncol*, 47: 122-132.
- [60] Drilon A, Cappuzzo F, Ou SHI, Camidge DR. (2017) Targeting MET in Lung Cancer: Will Expectations Finally Be MET? *J Thorac Oncol*, 12: 15-26.
- [61] Hu C-T, Wu J-R, Cheng C-C, Wu W-S. (2017) The Therapeutic Targeting of HGF/c-Met Signaling in Hepatocellular Carcinoma: Alternative Approaches. *Cancers*, 9: 58.
- [62] Zarei O, Benvenuti S, Ustun-Alkan F, Hamzeh-Mivehroud M, Dastmalchi S. (2016) Strategies of targeting the extracellular domain of RON tyrosine kinase receptor for cancer therapy and drug delivery. *J Cancer Res Clin Oncol*, 142: 2429-2446.
- [63] Batth IS, Yun H, Kumar AP. (2015) Recepteur d'origine nantais (RON), more than a kinase: Role in castrate-resistant prostate cancer. *Mol Carcinog*, 54: 937-946.
- [64] Benvenuti S, Lazzari L, Arnesano A, Li Chiavi G, Gentile A, Comoglio PM. (2011) Ron kinase transphosphorylation sustains MET oncogene addiction. *Cancer Res*, 71: 1945-1955.
- [65] Chang K, Karnad A, Zhao S, Freeman JW. (2015) Roles of c-Met and RON Kinases in tumor progression and their potential as therapeutic targets. *Oncotarget*, 6: 3507-3518.
- [66] Cui JJ, Tran-Dube M, Shen H, Nambu M, Kung PP, Pairish M, Jia L, Meng J, Funk L, Botrous I, McTigue M, Grodsky N, Ryan K, Padrique E, Alton G, Timofeevski

S, Yamazaki S, Li Q, Zou H, Christensen J, Mroczkowski B, Bender S, Kania RS, Edwards MP. (2011) Structure based drug design of crizotinib (PF-02341066), a potent and selective dual inhibitor of mesenchymal-epithelial transition factor (c-MET) kinase and anaplastic lymphoma kinase (ALK). *J Med Chem*, 54: 6342-6363.

[67] <http://www.rcsb.org/>

[68] http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/002489/WC500134759.pdf

[69] Solomon BJ, Mok T, Kim DW, Wu YL, Nakagawa K, Mekhail T, Felip E, Cappuzzo F, Paolini J, Usari T, Iyer S, Reisman A, Wilner KD, Tursi J, Blackhall F, Investigators P. (2014) First-line crizotinib versus chemotherapy in ALK-positive lung cancer. *N Engl J Med*, 371: 2167-2177.

[70] Dagogo-Jack I, Shaw AT. (2016) Crizotinib resistance: implications for therapeutic strategies. *Ann Oncol*, 27: iii42-iii50.

[71] Ye M, Zhang X, Li N, Zhang Y, Jing P, Chang N, Wu J, Ren X, Zhang J. (2016) ALK and ROS1 as targeted therapy paradigms and clinical implications to overcome crizotinib resistance. *Oncotarget*, 7: 12289-12304.

[72] Friboulet L, Li N, Katayama R, Lee CC, Gainor JF, Crystal AS, Michellys PY, Awad MM, Yanagitani N, Kim S, Pferdekamper AC, Li J, Kasibhatla S, Sun F, Sun X, Hua S, McNamara P, Mahmood S, Lockerman EL, Fujita N, Nishio M, Harris JL, Shaw AT, Engelman JA. (2014) The ALK inhibitor ceritinib overcomes crizotinib resistance in non-small cell lung cancer. *Cancer Discov*, 4: 662-673.

[73] Raedler LA. (2015) Zykadia (Ceritinib) Approved for Patients with Crizotinib-Resistant ALK-Positive Non-Small-Cell Lung Cancer. *American Health & Drug Benefits*, 8: 163-166.

[74] Minchinton AI, Tannock IF. (2006) Drug penetration in solid tumours. *Nat Rev Cancer*, 6: 583-592.

[75] Broekman F, Giovannetti E, Peters GJ. (2011) Tyrosine kinase inhibitors: Multi-targeted or single-targeted? *World J Clin Oncol*, 2: 80-93.

[76] Tibbitt MW, Dahlman JE, Langer R. (2016) Emerging Frontiers in Drug Delivery. *J Am Chem Soc*, 138: 704-717.

[77] Sato MR, Da Silva PB, De Souza RA, Dos Santos KC, Chorilli M. (2015) Recent advances in nanoparticle carriers for coordination complexes. *Curr Top Med Chem*, 15: 287-297.

- [78] Majumdar S, Siahaan TJ. (2012) Peptide-mediated targeted drug delivery. *Med Res Rev*, 32: 637-658.
- [79] Mezo G, Manea M. (2010) Receptor-mediated tumor targeting based on peptide hormones. *Expert Opin Drug Deliv*, 7: 79-96.
- [80] Millar RP, Lu ZL, Pawson AJ, Flanagan CA, Morgan K, Maudsley SR. (2004) Gonadotropin-releasing hormone receptors. *Endocr Rev*, 25: 235-275.
- [81] Choi JH, Gilks CB, Auersperg N, Leung PCK. (2006) Immunolocalization of gonadotropin-releasing hormone (GnRH)-I, GnRH-II, and type I GnRH receptor during follicular development in the human ovary. *J Clin Endocrinol Metab*, 91: 4562-4570.
- [82] Kottler ML, Starzec A, Carre MC, Lagarde JP, Martin A, Counis R. (1997) The genes for gonadotropin-releasing hormone and its receptor are expressed in human breast with fibrocystic disease and cancer. *Int J Cancer*, 71: 595-599.
- [83] Lin LS, Roberts VJ, Yen SS. (1995) Expression of human gonadotropin-releasing hormone receptor gene in the placenta and its functional relationship to human chorionic gonadotropin secretion. *J Clin Endocrinol Metab*, 80: 580-585.
- [84] Takeuchi S, Futamura N, Minoura H, Toyoda N. (1998) Possible direct effect of gonadotropin releasing hormone on human endometrium and decidua. *Life Sci*, 62: 1187-1194.
- [85] Tieva S, Stattin P, Wikström P, Bergh A, Damber JE. (2001) Gonadotropin-releasing hormone receptor expression in the human prostate. *Prostate*, 47: 276-284.
- [86] Cheng CK, Leung PCK. (2005) Molecular biology of gonadotropin-releasing hormone (GnRH)-I, GnRH-II, and their receptors in humans. *Endocr Rev*, 26: 283-306.
- [87] Millar RP. (2005) GnRHs and GnRH receptors. *Anim Reprod Sci*, 88: 5-28.
- [88] Neill JD. (2002) Minireview: GnRH and GnRH receptor genes in the human genome. *Endocrinology*, 143: 737-743.
- [89] Grundker C, Gunthert AR, Millar RP, Emons G. (2002) Expression of gonadotropin-releasing hormone II (GnRH-II) receptor in human endometrial and ovarian cancer cells and effects of GnRH-II on tumor cell proliferation. *J Clin Endocrinol Metab*, 87: 1427-1430.
- [90] Leung PCK, Cheng CK, Zhu XM. (2003) Multi-factorial role of GnRH-I and GnRH-II in the human ovary. *Mol Cell Endocrinol*, 202: 145-153.
- [91] Limonta P, Montagnani Marelli M, Mai S, Motta M, Martini L, Moretti RM. (2012) GnRH receptors in cancer: from cell biology to novel targeted therapeutic strategies. *Endocr Rev*, 33: 784-811.

- [92] Sakai M, Martinez-Arguelles DB, Patterson NH, Chaurand P, Papadopoulos V. (2015) In search of the molecular mechanisms mediating the inhibitory effect of the GnRH antagonist degarelix on human prostate cell growth. *PLoS One*, 10: e0120670.
- [93] Limonta P, Moretti RM, Marelli MM, Motta M. (2003) The biology of gonadotropin hormone-releasing hormone: Role in the control of tumor growth and progression in humans. *Front Neuroendocrinol*, 24: 279-295.
- [94] Matsuo H, Baba Y, Nair RM, Arimura A, Schally AV. (1971) Structure of the porcine LH- and FSH-releasing hormone. I. The proposed amino acid sequence. *Biochem Biophys Res Commun*, 43: 1334-1339.
- [95] Schneider JS, Rissman EF. (2008) Gonadotropin-releasing hormone II: A multi-purpose neuropeptide. *Integr Comp Biol*, 48: 588-595.
- [96] Chen A, Ganor Y, Rahimipour S, Ben-Aroya N, Koch Y, Levite M. (2002) The neuropeptides GnRH-II and GnRH-I are produced by human T cells and trigger laminin receptor gene expression, adhesion, chemotaxis and homing to specific organs. *Nat Med*, 8: 1421-1426.
- [97] Kang SK, Choi KC, Yang HS, Leung PC. (2003) Potential role of gonadotrophin-releasing hormone (GnRH)-I and GnRH-II in the ovary and ovarian cancer. *Endocr Relat Cancer*, 10: 169-177.
- [98] Cheon KW, Lee HS, Parhar IS, Kang IS. (2001) Expression of the second isoform of gonadotrophin-releasing hormone (GnRH-II) in human endometrium throughout the menstrual cycle. *Mol Hum Reprod*, 7: 447-452.
- [99] Millar RP. (2003) GnRH II and type II GnRH receptors. *Trends Endocrinol Metab*, 14: 35-43.
- [100] White RB, Eisen JA, Kasten TL, Fernald RD. (1998) Second gene for gonadotropin-releasing hormone in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95: 305-309.
- [101] Kauffman AS. (2004) Emerging functions of gonadotropin-releasing hormone II in mammalian physiology and behaviour. *J Neuroendocrinol*, 16: 794-806.
- [102] Millar R, Lowe S, Conklin D, Pawson A, Maudsley S, Troskie B, Ott T, Millar M, Lincoln G, Sellar R, Faurholm B, Scobie G, Kuestner R, Terasawa E, Katz A. (2001) A novel mammalian receptor for the evolutionarily conserved type II GnRH. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98: 9636-9641.
- [103] Cheung LWT, Wong AST. (2008) Gonadotropin-releasing hormone: GnRH receptor signaling in extrapituitary tissues. *FEBS J*, 275: 5479-5495.

- [104] Grundker C, Schlotawa L, Viereck V, Eicke N, Horst A, Kairies B, Emons G. (2004) Antiproliferative effects of the GnRH antagonist cetrorelix and of GnRH-II on human endometrial and ovarian cancer cells are not mediated through the GnRH type I receptor. *Eur J Endocrinol*, 151: 141-149.
- [105] De Maturana RL, Pawson AJ, Lu ZL, Davidson L, Maudsley S, Morgan K, Langdon SP, Millar RP. (2008) Gonadotropin-releasing hormone analog structural determinants of selectivity for inhibition of cell growth: Support for the concept of ligand-induced selective signaling. *Mol Endocrinol*, 22: 1711-1722.
- [106] Millar RP, Pawson AJ, Morgan K, Rissman EF, Lu Z-L. (2008) Diversity of actions of GnRHs mediated by ligand-induced selective signaling. *Front Neuroendocrinol*, 29: 17-35.
- [107] Millar RP, Pawson AJ. (2004) Outside-in and inside-out signaling: The new concept that selectivity of ligand binding at the gonadotropin-releasing hormone receptor is modulated by the intracellular environment. *Endocrinology*, 145: 3590-3593.
- [108] Kottler ML, Bergametti F, Carré MC, Morice S, Decoret E, Lagarde JP, Starzec A, Counis R. (1999) Tissue-specific pattern of variant transcripts of the human gonadotropin-releasing hormone receptor gene. *Eur J Endocrinol*, 140: 561-569.
- [109] Grosse R, Schöneberg T, Schultz G, Gudermann T. (1997) Inhibition of gonadotropin releasing hormone receptor signaling by expression of a splice variant of the human receptor. *Mol Endocrinol*, 11: 1305-1318.
- [110] Dondi D, Limonta P, Moretti RM, Marelli MM, Garattini E, Motta M. (1994) Antiproliferative effects of luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) agonists on human androgen-independent prostate cancer cell line DU 145: evidence for an autocrine-inhibitory LHRH loop. *Cancer Res*, 54: 4091-4095.
- [111] Limonta P, Moretti RM, Marelli MM, Dondi D, Parenti M, Motta M. (1999) The luteinizing hormone-releasing hormone receptor in human prostate cancer cells: messenger ribonucleic acid expression, molecular size, and signal transduction pathway. *Endocrinology*, 140: 5250-5256.
- [112] Eidne KA, Flanagan CA, Harris NS, Millar RP. (1987) Gonadotropin-releasing hormone (GnRH)-binding sites in human breast cancer cell lines and inhibitory effects of GnRH antagonists. *J Clin Endocrinol Metab*, 64: 425-432.
- [113] Moriya T, Suzuki T, Pilichowska M, Ariga N, Kimura N, Ouchi N, Nagura H, Sasano H. (2001) Immunohistochemical expression of gonadotropin releasing hormone receptor in human breast carcinoma. *Pathol Int*, 51: 333-337.

- [114] Kakar SS, Grizzle WE, Neill JD. (1994) The nucleotide sequences of human GnRH receptors in breast and ovarian tumors are identical with that found in pituitary. *Mol Cell Endocrinol*, 106: 145-149.
- [115] Pahwa GS, Kullander S, Vollmer G, Oberheuser F, Knuppen R, Emons G. (1991) Specific low affinity binding sites for gonadotropin-releasing hormone in human endometrial carcinomata. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 41: 135-142.
- [116] Moretti RM, Montagnani Marelli M, Van Groeninghen JC, Limonta P. (2002) Locally expressed LHRH receptors mediate the oncostatic and antimetastatic activity of LHRH agonists on melanoma cells. *J Clin Endocrinol Metab*, 87: 3791-3797.
- [117] Montagnani Marelli M, Moretti RM, Mai S, Muller O, Van Groeninghen JC, Limonta P. (2009) Novel insights into GnRH receptor activity: role in the control of human glioblastoma cell proliferation. *Oncol Rep*, 21: 1277-1282.
- [118] Keller G, Schally AV, Gaiser T, Nagy A, Baker B, Halmos G, Engel JB. (2005) Receptors for luteinizing hormone releasing hormone (LHRH) expressed in human non-Hodgkin's lymphomas can be targeted for therapy with the cytotoxic LHRH analogue AN-207. *Eur J Cancer*, 41: 2196-2202.
- [119] Pati D, Habibi HR. (1995) Inhibition of human hepatocarcinoma cell proliferation by mammalian and fish gonadotropin-releasing hormones. *Endocrinology*, 136: 75-84.
- [120] Krebs LJ, Wang X, Nagy A, Schally AV, Prasad PN, Liebow C. (2002) A conjugate of doxorubicin and an analog of Luteinizing Hormone-Releasing Hormone shows increased efficacy against oral and laryngeal cancers. *Oral oncology*, 38: 657-663.
- [121] Szepeshazi K, Schally AV, Halmos G. (2007) LH-RH receptors in human colorectal cancers: Unexpected molecular targets for experimental therapy. *Int J Oncol*, 30: 1485-1492.
- [122] Sion-Vardi N, Kaneti J, Segal-Abramson T, Giat J, Levy J, Sharoni Y. (1992) Gonadotropin-releasing hormone specific binding sites in normal and malignant renal tissue. *J Urol*, 148: 1568-1570.
- [123] Hao D, Sun L, Hu X, Hao X. (2017) 99mTc-LHRH in tumor receptor imaging. *Oncol Lett*, 14: 569-578.
- [124] Szepeshazi K, Schally AV, Block NL, Halmos G, Nadji M, Szalontay L, Vidaurre I, Abi-Chaker A, Rick FG. (2013) Powerful inhibition of experimental human pancreatic cancers by receptor targeted cytotoxic LH-RH analog AEZS-108. *Oncotarget*, 4: 751-760.

- [125] Straub B, Müller M, Krause H, Schrader M, Goessl C, Heicappell R, Miller K. (2001) Increased incidence of luteinizing hormone-releasing hormone receptor gene messenger rna expression in hormone-refractory human prostate cancers. *Clin Cancer Res*, 7: 2340-2343.
- [126] Chien CH, Chen CH, Lee CYG, Chang TC, Chen RJ, Chow SN. (2004) Detection of gonadotropin-releasing hormone receptor and its mRNA in primary human epithelial ovarian cancers. *Int J Gynecol Cancer*, 14: 451-458.
- [127] Chen CL, Cheung LWT, Lau MT, Choi JH, Auersperg N, Wang HS, Wong AST, Leung PCK. (2007) Differential role of gonadotropin-releasing hormone on human ovarian epithelial cancer cell invasion. *Endocrine*, 31: 311-320.
- [128] Cheung LWT, Leung PCK, Wong AST. (2006) Gonadotropin-releasing hormone promotes ovarian cancer cell invasiveness through c-Jun NH2-terminal kinase-mediated activation of matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9. *Cancer Res*, 66: 10902-10910.
- [129] Emons G, Ortmann O, Schulz KD, Schally AV. (1997) Growth-inhibitory actions of analogues of luteinizing hormone releasing hormone on tumor cells. *Trends Endocrinol Metab*, 8: 355-362.
- [130] Poon SL, Hammond GT, Leung PC. (2009) Epidermal growth factor-induced GnRH-II synthesis contributes to ovarian cancer cell invasion. *Mol Endocrinol*, 23: 1646-1656.
- [131] Kéri G, Balogh A, Szöke B, Teplán I, Csuka O. (1991) Gonadotropin-releasing hormone analogues inhibit cell proliferation and activate signal transduction pathways in MDA-MB-231 human breast cancer cell line. *Tumour Biol*, 12: 61-67.
- [132] Fuseya T. (1996) Evidence for common signalling pathways of GnRH receptor and Fas in tumors. *Oncol Rep*, 3: 1111-1113.
- [133] Marelli MM, Moretti RM, Mai S, Procacci P, Limonta P. (2007) Gonadotropin-releasing hormone agonists reduce the migratory and the invasive behavior of androgen-independent prostate cancer cells by interfering with the activity of IGF-I. *Int J Oncol*, 30: 261-271.
- [134] Moretti RM, Marelli MM, Mai S, Limonta P. (2008) Gonadotropin-releasing hormone agonists suppress melanoma cell motility and invasiveness through the inhibition of $\alpha 3$ integrin and MMP-2 expression and activity. *Int J Oncol*, 33: 405-413.
- [135] Parborell F, Irusta G, Celín AR, Tesone M. (2008) Regulation of ovarian angiogenesis and apoptosis by GnRH-I analogs. *Mol Reprod Dev*, 75: 623-631.

- [136] Gründker C, Emons G. (2017) The role of gonadotropin-releasing hormone in cancer cell proliferation and metastasis. *Front Endocrinol*, 8: 187.
- [137] Aguilar-Rojas A, Perez-Solis MA, Maya-Nunez G. (2016) The gonadotropin-releasing hormone system: Perspectives from reproduction to cancer (Review). *Int J Oncol*, 48: 861-868.
- [138] Kraus S, Naor Z, Seger R. (2001) Intracellular signaling pathways mediated by the gonadotropin-releasing hormone (GnRH) receptor. *Arch Med Res*, 32: 499-509.
- [139] Maggi R, Cariboni AM, Marelli MM, Moretti RM, André V, Marzagalli M, Limonta P. (2016) GnRH and GnRH receptors in the pathophysiology of the human female reproductive system. *Hum Reprod Update*, 22: 358-381.
- [140] Naor Z, Benard O, Seger R. (2000) Activation of MAPK cascades by G-protein-coupled receptors: The case of gonadotropin-releasing hormone receptor. *Trends Endocrinol Metab*, 11: 91-99.
- [141] Marelli MM, Moretti RM, Dondi D, Motta M, Limonta P. (1999) Luteinizing hormone-releasing hormone agonists interfere with the mitogenic activity of the insulin-like growth factor system in androgen- independent prostate cancer cells. *Endocrinology*, 140: 329-334.
- [142] Yates C, Wells A, Turner T. (2005) Luteinising hormone-releasing hormone analogue reverses the cell adhesion profile of EGFR overexpressing DU-145 human prostate carcinoma subline. *Br J Cancer*, 92: 366-375.
- [143] Baumann KH, Kiesel L, Kaufmann M, Bastert G, Runnebaum B. (1993) Characterization of binding sites for a GnRH-agonist (buserelin) in human breast cancer biopsies and their distribution in relation to tumor parameters. *Breast Cancer Res Treat*, 25: 37-46.
- [144] Fekete M, Wittliff JL, Schally AV. (1989) Characteristics and distribution of receptors for [d-trp6]- luteinizing hormone-releasing hormone, somatostatin, epidermal growth factor, and sex steroids in 500 biopsy samples of human breast cancer. *J Clin Lab Anal*, 3: 137-147.
- [145] Hurley DM, Brian R, Outch K, Stockdale J, Fry A, Hackman C, Clarke I, Burger HG. (1984) Induction of Ovulation and Fertility in Amenorrheic Women by Pulsatile Low-Dose Gonadotropin-Releasing Hormone. *N Engl J Med*, 310: 1069-1074.
- [146] Harvey HA, Lipton A, Max DT, Pearlman HG, Diaz-Perches R, de la Garza J. (1985) Medical castration produced by the GnRH analogue leuprolide to treat metastatic breast cancer. *J Clin Oncol*, 3: 1068-1072.

- [147] Brown J, Farquhar C. (2014) Endometriosis: an overview of Cochrane Reviews. *Cochrane Database Syst Rev*, 3: CD009590.
- [148] Kumar P, Sharma A. (2014) Gonadotropin-releasing hormone analogs: Understanding advantages and limitations. *J Hum Reprod Sci*, 7: 170-174.
- [149] David Crawford E, Phillips JM. (2011) Six-month gonadotropin releasing hormone (GnRH) agonist depots provide efficacy, safety, convenience, and comfort. *Cancer Manag. Res.*, 3: 201-209.
- [150] Tunn UW. (2011) A 6-month depot formulation of leuprolide acetate is safe and effective in daily clinical practice: a non-interventional prospective study in 1273 patients. *BMC Urol*, 11: 15.
- [151] Corbin A. (1982) From contraception to cancer: a review of the therapeutic applications of LHRH analogues as antitumor agents. *Yale J Biol Med*, 55: 27-47.
- [152] Montagnani Marelli M, Moretti RM, Januszkiewicz-Caulier J, Motta M, Limonta P. (2006) Gonadotropin-releasing hormone (GnRH) receptors in tumors: a new rationale for the therapeutical application of GnRH analogs in cancer patients? *Curr Cancer Drug Targets*, 6: 257-269.
- [153] Vincze B, Pályi I, Daubner D, Kremmer T, Számel I, Bodrogi I, Sugár J, Sepro, x030B, di J, Mezo, x030B, I., Teplán I, Eckhardt S. (1991) Influence of luteinizing hormone-releasing hormone agonists on human mammary carcinoma cell lines and their xenografts. *J Steroid Biochem*, 38: 119-126.
- [154] Marelli MM, Moretti RM, Mai S, Müller O, Van Groeninghen JC, Limonta P. (2009) Novel insights into GnRH receptor activity: Role in the control of human glioblastoma cell proliferation. *Oncol Rep*, 21: 1277-1282.
- [155] So WK, Cheng JC, Poon SL, Leung PC. (2008) Gonadotropin-releasing hormone and ovarian cancer: a functional and mechanistic overview. *Febs j*, 275: 5496-5511.
- [156] Wilkinson SJ, Kucukmetin A, Cross P, Darby S, Gnanapragasam VJ, Calvert AH, Robson CN, Edmondson RJ. (2008) Expression of gonadotrophin releasing hormone receptor I is a favorable prognostic factor in epithelial ovarian cancer. *Hum Pathol*, 39: 1197-1204.
- [157] Hazum E, Koch Y, Liscovitch M, Amsterdam A. (1985) Intracellular pathways of receptor-bound GnRH agonist in pituitary gonadotropes. *Cell Tissue Res*, 239: 3-8.
- [158] Jennes L, Coy D, Conn PM. (1986) Receptor-mediated uptake of GnRH agonist and antagonists by cultured gonadotropes: evidence for differential intracellular routing. *Peptides*, 7: 459-463.

- [159] Schwartz I, Hazum E. (1987) Internalization and recycling of receptor-bound gonadotropin-releasing hormone agonist in pituitary gonadotropes. *J Biol Chem*, 262: 17046-17050.
- [160] Pawson AJ, Faccenda E, Maudsley S, Lu ZL, Naor Z, Millar RP. (2008) Mammalian type I gonadotropin-releasing hormone receptors undergo slow, constitutive, agonist-independent internalization. *Endocrinology*, 149: 1415-1422.
- [161] Liu SV, Schally AV, Hawes D, Xiong S, Fazli L, Gleave M, Cai J, Groshen S, Brands F, Engel J, Pinski J. (2010) Expression of receptors for Luteinizing Hormone-Releasing Hormone (LH-RH) in prostate cancers following therapy with LH-RH agonists. *Clin Cancer Res*, 16: 4675-7680.
- [162] Nagy A, Schally AV, Armatis P, Szepeshazi K, Halmos G, Kovacs M, Zarandi M, Groot K, Miyazaki M, Jungwirth A, Horvath J. (1996) Cytotoxic analogs of luteinizing hormone-releasing hormone containing doxorubicin or 2-pyrrolinodoxorubicin, a derivative 500-1000 times more potent. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93: 7269-7273.
- [163] Szabo I, Bosze S, Orban E, Sipos E, Halmos G, Kovacs M, Mezo G. (2015) Comparative in vitro biological evaluation of daunorubicin containing GnRH-I and GnRH-II conjugates developed for tumor targeting. *J Pept Sci*, 21: 426-435.
- [164] Sower SA, Chiang YC, Lovas S, Conlon JM. (1992) Primary structure and biological activity of a third gonadotropin-releasing hormone from lamprey brain. *Endocrinology*, 132: 1125-1131.
- [165] Mezo G, Manea M, Szabo I, Vincze B, Kovacs M. (2008) New Derivatives of GnRH as Potential Anticancer Therapeutic Agents. *Current Medicinal Chemistry*, 15: 2366-2379.
- [166] Kovacs M, Seprodi J, Koppan M, Horvath JE, Vincze B, Teplan I, Flerko B. (2002) Lamprey gonadotropin hormone-releasing hormone-III has no selective follicle-stimulating hormone-releasing effect in rats. *J Neuroendocrinol*, 14: 647-655.
- [167] Lovas S, Palyi I, Vincze B, Horvath J, Kovacs M, Mezo I, Toth G, Teplan I, Murphy RF. (1998) Direct anticancer activity of gonadotropin-releasing hormone-III. *J Pept Res*, 52: 384-389.
- [168] Kovács M, Vincze B, Horváth JE, Seprodi J. (2007) Structure-activity study on the LH- and FSH-releasing and anticancer effects of gonadotropin-releasing hormone (GnRH)-III analogs. *Peptides*, 28: 821-829.

- [169] Nagy A, Schally AV. (2005) Targeting of cytotoxic luteinizing hormone-releasing hormone analogs to breast, ovarian, endometrial, and prostate cancers. *Biol Reprod*, 73: 851-859.
- [170] Gründker C, Ernst J, Reutter M, Ghadimi BM, Emons G. (2011) Effective targeted chemotherapy using AEZS-108 (AN-152) for LHRH receptor-positive pancreatic cancers. *Oncol Rep*, 26: 629-635.
- [171] Laizure SC, Herring V, Hu Z, Witbrodt K, Parker RB. (2013) The role of human carboxylesterases in drug metabolism: have we overlooked their importance? *Pharmacotherapy*, 33: 210-222.
- [172] Orbán E, Mezo G, Schlage P, Csík G, Kulić Z, Ansorge P, Fellingner E, Möller HM, Manea M. (2011) In vitro degradation and antitumor activity of oxime bond-linked daunorubicin-GnRH-III bioconjugates and DNA-binding properties of daunorubicin-amino acid metabolites. *Amino Acids*, 41: 469-483.
- [173] Schlage P, Mezo G, Orban E, Bosze S, Manea M. (2011) Anthracycline-GnRH derivative bioconjugates with different linkages: synthesis, in vitro drug release and cytostatic effect. *J Control Release*, 156: 170-178.
- [174] Kapuvári B, Hegedüs R, Schulcz Á, Manea M, Tóvári J, Gacs A, Vincze B, Mező G. (2016) Improved in vivo antitumor effect of a daunorubicin - GnRH-III bioconjugate modified by apoptosis inducing agent butyric acid on colorectal carcinoma bearing mice. *Invest New Drugs*, 34: 416-423.
- [175] Manea M, Tóvári J, Tejeda M, Schulcz Á, Kapuvári B, Vincze B, Mezo G. (2012) In-vivo antitumour effect of daunorubicin-GnRH-III derivative conjugates on colon carcinoma-bearing mice. *Anti-Cancer Drugs*, 23: 90-97.
- [176] Karampelas T, Argyros O, Sayyad N, Spyridaki K, Pappas C, Morgan K, Kolios G, Millar RP, Liapakis G, Tzakos AG, Fokas D, Tamvakopoulos C. (2014) GnRH-Gemcitabine conjugates for the treatment of androgen-independent prostate cancer: pharmacokinetic enhancements combined with targeted drug delivery. *Bioconj Chem*, 25: 813-823.
- [177] Rahimipour S, Ben-Aroya N, Ziv K, Chen A, Fridkin M, Koch Y. (2003) Receptor-mediated targeting of a photosensitizer by its conjugation to gonadotropin-releasing hormone analogues. *J Med Chem*, 46: 3965-3974.
- [178] Aggarwal S, Ndinguri MW, Solipuram R, Wakamatsu N, Hammer RP, Ingram D, Hansel W. (2011) [DLys(6)]-luteinizing hormone releasing hormone-curcumin conjugate inhibits pancreatic cancer cell growth in vitro and in vivo. *Int J Cancer*, 129: 1611-1623.

- [179] Yablokova TV, Chelushkin PS, Dorosh MY, Efremov AM, Orlov SV, Burov SV. (2012) Synthesis of GnRH analogues and their application in targeted gene delivery systems. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 38: 22-29.
- [180] Argyros O, Karampelas T, Asvos X, Varela A, Sayyad N, Papakyriakou A, Davos CH, Tzakos AG, Fokas D, Tamvakopoulos C. (2016) Peptide-Drug conjugate gnrh-sunitinib targets angiogenesis selectively at the site of action to inhibit tumor growth. *Cancer Res.*, 76: 1181-1192.
- [181] Kumar R, Crouthamel MC, Rominger DH, Gontarek RR, Tummino PJ, Levin RA, King AG. (2009) Myelosuppression and kinase selectivity of multikinase angiogenesis inhibitors. *Br J Cancer*, 101: 1717-1723.
- [182] Aparicio-Gallego G, Blanco M, Figueroa A, García-Campelo R, Valladares-Ayerbes M, Grande-Pulido E, Antón-Aparicio L. (2011) New insights into molecular mechanisms of sunitinib-associated side effects. *Mol Cancer Ther*, 10: 2215-2223.
- [183] Michaelson MD, Oudard S, Houede N, Maurina T, Ou YC, Sengeløv L, Daugaard G, Saad F, Ostler P, Jones R, Bahl A, Stenzl A, Gschwend J, Laestadius F, Ullén A, Castellano D, Maneval EC, Wang SL, Chen I, Lechuga MJ, Paolini J. (2014) Randomized, placebo-controlled, phase III trial of sunitinib plus prednisone versus prednisone alone in progressive, metastatic, castration-resistant prostate cancer. *J Clin Oncol*, 32: 76-82.
- [184] Bergh J, Bondarenko IM, Lichinitser MR, Liljegren A, Greil R, Voytko NL, Makhson AN, Cortes J, Lortholary A, Bischoff J, Chan A, Delaloge S, Huang X, Kern KA, Giorgetti C. (2012) First-line treatment of advanced breast cancer with sunitinib in combination with docetaxel versus docetaxel alone: Results of a prospective, randomized phase III study. *J Clin Oncol*, 30: 921-929.
- [185] Cai C, Chen QB, Han ZD, Zhang YQ, He HC, Chen JH, Chen YR, Yang SB, Wu YD, Zeng YR, Qin GQ, Liang YX, Dai QS, Jiang FN, Wu SL, Zeng GH, Zhong WD, Wu CL. (2015) miR-195 inhibits tumor progression by targeting RPS6KB1 in human prostate cancer. *Clin Cancer Res*, 21: 4922-4934.
- [186] Guo H, Gallazzi F, Sklar LA, Miao Y. (2011) A novel indium-111-labeled gonadotropin-releasing hormone peptide for human prostate cancer imaging. *Bioorg Med Chem Lett.*, 21: 5184-5187.
- [187] Guo H, Lu J, Hathaway H, Royce ME, Prossnitz ER, Miao Y. (2011) Synthesis and evaluation of novel gonadotropin-releasing hormone receptor-targeting peptides. *Bioconjug Chem*, 22: 1682-1689.

- [188] Olberg DE, Andressen KW, Levy FO, Klaveness J, Haraldsen I, Sutcliffe JL. (2014) Synthesis and in vitro evaluation of small-molecule [¹⁸F] labeled gonadotropin-releasing hormone (GnRH) receptor antagonists as potential PET imaging agents for GnRH receptor expression. *Bioorg Med Chem Lett.*, 24: 1846-1850.
- [189] Zoghi M, Niazi A, Jalilian AR, Johari-Daha F, Alirezapour B, Ramezanpour S. (2016) Development of a Ga-68 labeled triptorelin analog for GnRH receptor imaging. *Radiochimica Acta*, 104: 247-255.
- [190] Nederpelt I, Georgi V, Schiele F, Nowak-Reppel K, Fernández-Montalván AE, Ijzerman AP, Heitman LH. (2016) Characterization of 12 GnRH peptide agonists - A kinetic perspective. *Br J Pharmacol.*, 173: 128-141.
- [191] Schottelius M, Berger S, Poethko T, Schwaiger M, Wester HJ. (2008) Development of novel (68)Ga- and (18)F-labeled GnRH-I analogues with high GnRHR-targeting efficiency. *Bioconjug Chem*, 19: 1256-1268.
- [192] Finch AR, Sedgley KR, Caunt CJ, McArdle CA. (2008) Plasma membrane expression of GnRH receptors: Regulation by antagonists in breast, prostate, and gonadotrope cell lines. *J Endocrinol*, 196: 353-367.
- [193] Sánchez CA, Mercado AJ, Contreras HR, Cabezas JC, Huidobro CC, Castellón EA. (2012) Pharmacoperone IN3 enhances the apoptotic effect of leuprolide in prostate cancer cells by increasing the gonadotropin-releasing hormone receptor in the cell membrane. *Anti-Cancer Drugs*, 23: 959-969.
- [194] Finch AR, Caunt CJ, Armstrong SP, McArdle CA. (2010) Plasma membrane expression of gonadotropin-releasing hormone receptors: Regulation by peptide and nonpeptide antagonists. *Mol Endocrinol*, 24: 423-435.
- [195] Angelucci C, Lama G, Iacopino F, Ferracuti S, Bono AV, Millar RP, Sica G. (2009) GnRH receptor expression in human prostate cancer cells is affected by hormones and growth factors. *Endocrine*, 36: 87-97.
- [196] Lama G, Papi M, Angelucci C, Maulucci G, Sica G, De Spirito M. (2013) Leuprorelin acetate long-lasting effects on GnRH receptors of prostate cancer cells: an atomic force microscopy study of agonist/receptor interaction. *PLoS One*, 8: e52530.
- [197] Hegedus R, Manea M, Orban E, Szabo I, Kiss E, Sipos E, Halmos G, Mezo G. (2012) Enhanced cellular uptake and in vitro antitumor activity of short-chain fatty acid acylated daunorubicin-GnRH-III bioconjugates. *Eur J Med Chem*, 56: 155-165.
- [198] Montagnani Marelli M, Manea M, Moretti RM, Marzagalli M, Limonta P. (2015) Oxime bond-linked daunorubicin-GnRH-III bioconjugates exert antitumor activity in

castration-resistant prostate cancer cells via the type I GnRH receptor. *Int J Oncol*, 46: 243-253.

[199] Achilli C, Ciana A, Fagnoni M, Balduini C, Minetti G. (2013) Susceptibility to hydrolysis of phenylboronic pinacol esters at physiological pH. *Cent Eur J Chem*, 11: 137-139.

[200] Flaten GE, Dhanikula AB, Luthman K, Brandl M. (2006) Drug permeability across a phospholipid vesicle based barrier: A novel approach for studying passive diffusion. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 27: 80-90.

[201] Garner KL, Perrett RM, Voliotis M, Bowsher C, Pope GR, Pham T, Caunt CJ, Tsaneva-Atanasova K, McArdle CA. (2016) Information transfer in gonadotropin-releasing hormone (GnRH) signaling: Extracellular signal-regulated kinase (ERK)-mediated feedback loops control hormone sensing. *J Biol Chem*, 291: 2246-2259.

[202] Mezo G, Czajlik A, Manea M, Jakab A, Farkas V, Majer Z, Vass E, Bodor A, Kapuvári B, Boldizsar M, Vincze B, Csuka O, Kovacs M, Przybylski M, Perczel A, Hudecz F. (2007) Structure, enzymatic stability and antitumor activity of sea lamprey GnRH-III and its dimer derivatives. *Peptides*, 28: 806-820.

[203] Leurs U, Lajkó E, Mez G, Orbán E, Öhlschläger P, Marquardt A, Köhidai L, Manea M. (2012) GnRH-III based multifunctional drug delivery systems containing daunorubicin and methotrexate. *Eur J Med Chem.*, 52: 173-183.

[204] Takeuchi K, Ito F. (2011) Receptor tyrosine kinases and targeted cancer therapeutics. *Biol Pharm Bull*, 34: 1774-1780.

[205] Malik SM, Maher VE, Bijwaard KE, Becker RL, Zhang L, Tang SW, Song P, Liu Q, Marathe A, Gehrke B, Helms W, Hanner D, Justice R, Pazdur R. (2014) U.S. Food and Drug Administration approval: crizotinib for treatment of advanced or metastatic non-small cell lung cancer that is anaplastic lymphoma kinase positive. *Clin Cancer Res*, 20: 2029-2034.

[206] Lutterbach B, Zeng Q, Davis LJ, Hatch H, Hang G, Kohl NE, Gibbs JB, Pan BS. (2007) Lung cancer cell lines harboring MET gene amplification are dependent on Met for growth and survival. *Cancer Res*, 67: 2081-2088.

[207] Nisa L, Hafliger P, Poliakova M, Giger R, Francica P, Aebersold DM, Charles RP, Zimmer Y, Medova M. (2017) PIK3CA hotspot mutations differentially impact responses to MET targeting in MET-driven and non-driven preclinical cancer models. *Mol Cancer*, 16: 93.

- [208] Karampelas T, Argyros O, Sayyad N, Spyridaki K, Pappas C, Morgan K, Kolios G, Millar RP, Liapakis G, Tzacos AG, Fokas D, Tamvakopoulos C. (2014) GnRH-gemcitabine conjugates for the treatment of androgen-independent prostate cancer: Pharmacokinetic enhancements combined with targeted drug delivery. *Bioconjugate Chemistry*, 25: 813-823.
- [209] de Koning PD, McAndrew D, Moore R, Moses IB, Boyles DC, Kissick K, Stanchina CL, Cuthbertson T, Kamatani A, Rahman L, Rodriguez R, Urbina A, Sandoval A, Rose PR. (2011) Fit-for-Purpose Development of the Enabling Route to Crizotinib (PF-02341066). *Organic Process Research & Development*, 15: 1018-1026.
- [210] Emons G, Gorchev G, Harter P, Wimberger P, Stahle A, Hanker L, Hilpert F, Beckmann MW, Dall P, Grundker C, Sindermann H, Sehouli J. (2014) Efficacy and safety of AEZS-108 (LHRH agonist linked to doxorubicin) in women with advanced or recurrent endometrial cancer expressing LHRH receptors: a multicenter phase 2 trial (AGO-GYN5). *Int J Gynecol Cancer*, 24: 260-265.
- [211] Popovics P, Schally AV, Szalontay L, Block NL, Rick FG. (2014) Targeted cytotoxic analog of luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH), AEZS-108 (AN-152), inhibits the growth of DU-145 human castration-resistant prostate cancer in vivo and in vitro through elevating p21 and ROS levels. *Oncotarget*, 5: 4567-4578.
- [212] Szepeshazi K, Schally AV, Keller G, Block NL, Benten D, Halmos G, Szalontay L, Vidaurre I, Jaszberenyi M, Rick FG. (2012) Receptor-targeted therapy of human experimental urinary bladder cancers with cytotoxic LH-RH analog AN-152 (AEZS-108). *Oncotarget*, 3: 686-699.
- [213] Vacondio F, Silva C, Mor M, Testa B. (2010) Qualitative structure-metabolism relationships in the hydrolysis of carbamates. *Drug Metabolism Reviews*, 42: 551-589.
- [214] Alouane A, Labruère R, Le Saux T, Schmidt F, Jullien L. (2015) Self-immolative spacers: Kinetic aspects, structure-property relationships, and applications. *Angew Chem Int Ed Engl*, 54: 7492-7509.
- [215] Ghosh AK, Brindisi M. (2015) Organic carbamates in drug design and medicinal chemistry. *J Med Chem*, 58: 2895-2940.
- [216] Sahu A, Prabhash K, Noronha V, Joshi A, Desai S. (2013) Crizotinib: A comprehensive review. *South Asian J Cancer*, 2: 91-97.
- [217] Tanizaki J, Okamoto I, Okamoto K, Takezawa K, Kuwata K, Yamaguchi H, Nakagawa K. (2011) MET tyrosine kinase inhibitor crizotinib (PF-02341066) shows

differential antitumor effects in non-small cell lung cancer according to MET alterations. *J Thorac Oncol*, 6: 1624-1631.

[218] Wang C, Ma Y, Feng S, Liu K, Zhou N. (2015) Gonadotropin-releasing hormone receptor-targeted paclitaxel-degarelix conjugate: synthesis and in vitro evaluation. *J Pept Sci*, 21: 569-576.

[219] Cooper GM, Hausman RE, *The Cell: A Molecular Approach*. Fourth Edition., Sinauer Associates, Sunderland, 2007: 556-566.

[220] Mindell JA. (2012) Lysosomal acidification mechanisms. *Annu Rev Physiol*, 74: 69-86.

[221] Swietach P, Hulikova A, Patiar S, Vaughan-Jones RD, Harris AL. (2012) Importance of intracellular pH in determining the uptake and efficacy of the weakly basic chemotherapeutic drug, doxorubicin. *PLoS One*, 7: e35949.

[222] Zhong YJ, Shao LH, Li Y. (2013) Cathepsin B-cleavable doxorubicin prodrugs for targeted cancer therapy (Review). *Int J Oncol*, 42: 373-383.

11. Saját publikációk

Murányi J, Varga A, Gurbi B, Gyulavári P, Mező G, Vántus T

In vitro imaging and quantification of the drug targeting efficiency of fluorescently labeled GnRH analogues

JOVE-JOURNAL OF VISUALIZED EXPERIMENTS 2017: (121) e55529. (2017)
IF:1,232

Murányi J, Gyulavári P, Varga A, Bökönyi G, Tanai H, Vántus T, Pap D, Ludányi K, Mező G, Kéri G

Synthesis, characterization and systematic comparison of FITC-labelled GnRH-I, -II and -III analogues on various tumour cells

JOURNAL OF PEPTIDE SCIENCE 22: (8) pp. 552-560. (2016)
IF:1,972

12. Köszönetnyilvánítás

Köszönetemet szeretném kifejezni témavezetőmnek, Dr. Vántus Tibornak a PhD tanulmányaim során nyújtott szakmai segítségért és baráti tanácsokért.

Köszönettel tartozom korábbi témavezetőmnek Prof. Dr. Kéri Györgynek a lehetőségért, hogy munkacsoportjában dolgozhattam és elindított kutatói pályámon. *Köszönöm a bizalmat, hogy PhD hallgatódnak fogadtál és súlyos betegséged ellenére is rendületlenül támogattál!*

Köszönöm továbbá:

A Semmelweis Egyetem Orvosi Vegytani, Molekuláris Biológiai és Patobiokémiai Intézet jelenlegi, és volt igazgatójának Prof. Dr. Bánhegyi Gábornak és Prof. Dr. Mandl Józsefnek, hogy kutatómunkám feltételeit biztosította.

Az MTA-SE Patobiokémiai Kutatócsoport tagjainak, Dr. Varga Attilának, Dr. Brauswetter Diának, Dr. Pénzes Kingának, Bökönyi Gyöngyinek, Tanai Henriettnek, Gyulavári Pálnak és Gurbi Biankának, mind a szakmai, mind pedig a baráti téren nyújtott segítséget.

Az MTA-ELTE Peptidkémiai Kutatócsoport vezetőjének Prof. Dr. Mező Gábornak a közös kutatómunkát, a szakmai tanácsokat és a biztatást.

A tömegspektrometriás méréseket Dr. Schlosser Gittának (ELTE Analitikai Kémiai Tanszék), Dr. Ludányi Krisztinának (SE Gyógyszerészeti Intézet) és Dr. Illyés Eszternek (Vichem Chemie Kutató Kft.).

A szerves kémiai szintézisek terén nyújtott segítséget Dr. Hegedűs Lászlónak (BME Szerves Kémia és Technológia Tanszék).

A Semmelweis Egyetem Élettani Intézetének hozzájárulását, hogy Zeiss Confocal LSM 710 mikroszkópjukat rendelkezésemre bocsátották.

A Vichem Chemie Kutató Kft. támogatását és munkatársainak segítő közreműködését.

Végezetül hálával és köszönettel tartozom családtagjaimnak és hozzátartozóimnak, hogy kitartóan támogattak és biztattak PhD tanulmányaim folyamán.

13. Melléklet

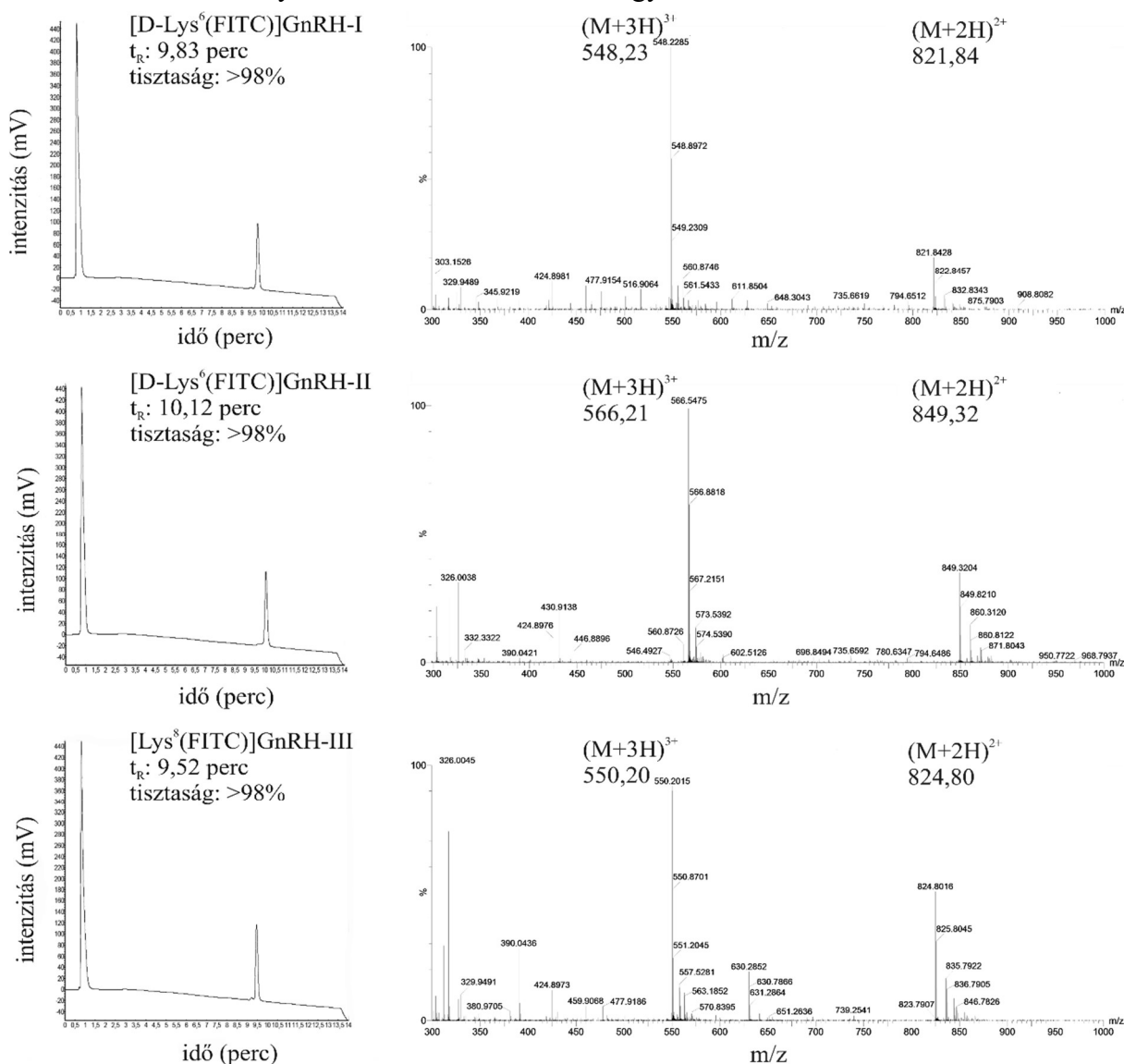
13.1 FITC-GnRH konjugátumok

13.1.1 Szerkezetigazolás

MS analízis (SE Gyógyszerészeti Intézet):

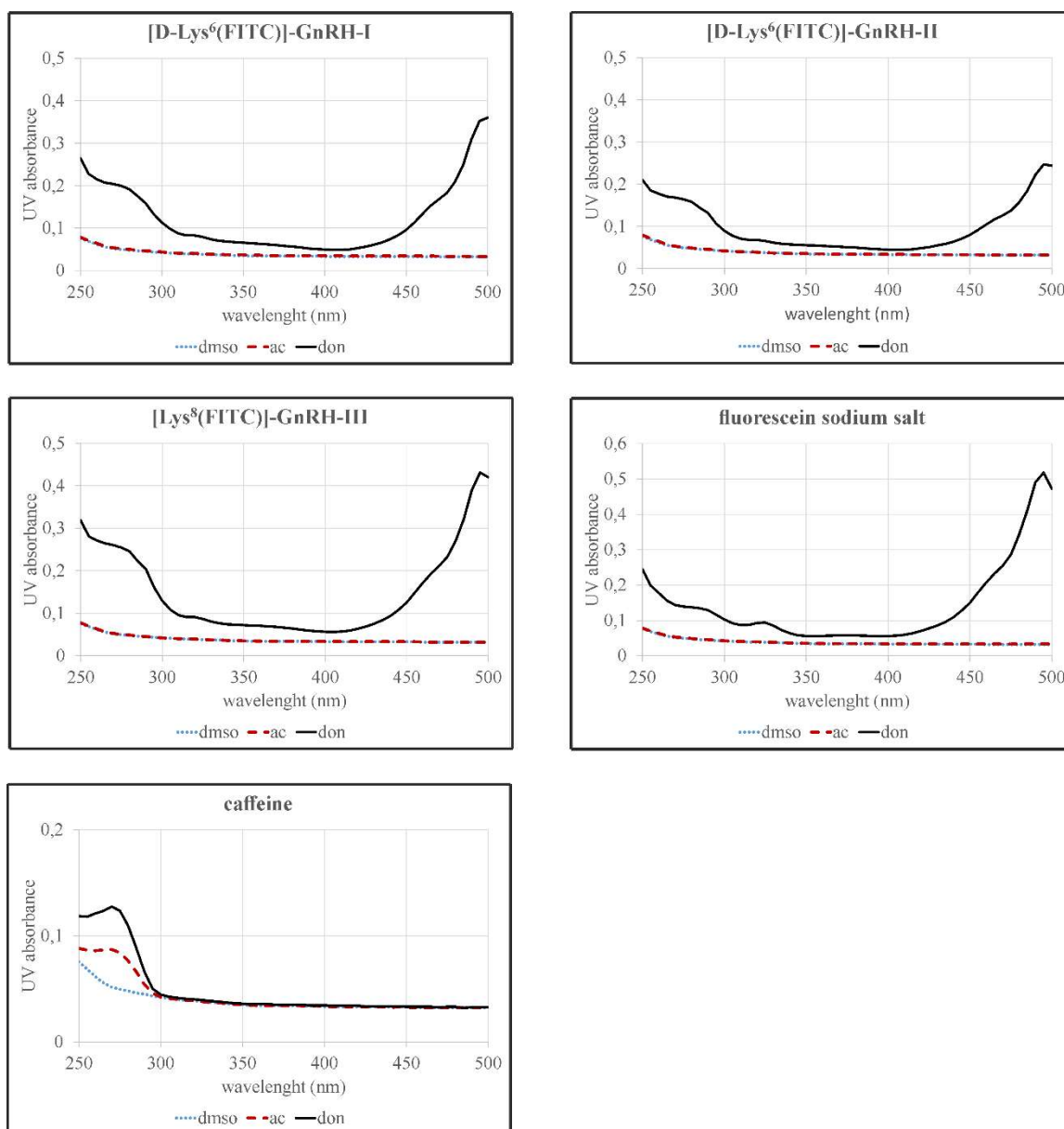
A készülék típusa: Waters Q-ToF Premier Mass Spectrometer

A detektálás ESI-MS pozitív ion módban, 100-1800 Da között történt. A minták acetonitril/víz 1:2 arányú 0,1% TFA-t tartalmazó elegyében lettek feloldva.



50. Ábra: HPLC-UV kromatogramok (HPLC III. módszer, $\lambda=220$ nm) és ESI-MS felvételek (SE Gyógyszerészeti Intézet): [D-Lys⁶(FITC)]-GnRH-I, [D-Lys⁶(FITC)]-GnRH-II, [Lys⁸(FITC)]-GnRH-III

13.1.2. PAMPA UV-VIS spektrumok



51. Ábra: Az UV-VIS abszorbancia spektrum: [D-Lys⁶(FITC)]-GnRH-I, [D-Lys⁶(FITC)]-GnRH-II, [Lys⁸(FITC)]-GnRH-III, fluoreszcein és koffein. DMSO kontroll: kék pontozott vonal; donor: fekete folytonos vonal; akceptor: piros szaggatott vonal.

13.1.3 PAMPA számítási képlet

$$Pe = \frac{-\ln\left(1 - \frac{Ca}{Ce}\right)}{A * \left(\frac{1}{Vd} + \frac{1}{Va}\right) * t}$$

$$Ce = (Cd * Vd + Ca * Va) / (Vd + Va)$$

$$R = 1 - \frac{Cd * Vd + Ca * Va}{C0 * Vd}$$

ahol:

Pe = effektív permeabilitási együttható (10^{-6} cm/s)

R = tömeg retenció (százalékos aránya a vegyület azon hányadának, amely a vizsgálat során eltűnik az oldat fázisból, ennek oka lehet adszorpció, vagy kicsapódás)

A = membrán felület (cm^2)

C₀ = kiindulási donor koncentráció*

C_a = végső akceptor koncentráció*

C_d = végső donor koncentráció*

C_e = egyensúlyi koncentráció

t = inkubálás ideje (sec)

V_a = akceptor térfogat (ml)

V_d = donor térfogat (ml)

*: A koncentráció számítása a 280 nm-en mért abszorbancaértékek alapján történt.

13.1.4 Áramlási citométer számítási képlet

A VII. táblázat a relatív MFI értékeket tartalmazza:

$$\text{relatív MFI (vegyület; [x(h); y(μM)])} = \frac{\text{MFI (vegyület; [x(h); y(μM)])}}{\text{MFI (DMSO kontrol; [x(h)])}} - 1$$

ahol: y=1 μM; x=1 vagy 5 óra;

MFI: fluoreszcencia intenzitás medián (áramlási citométer által számított, logaritmizált érték)

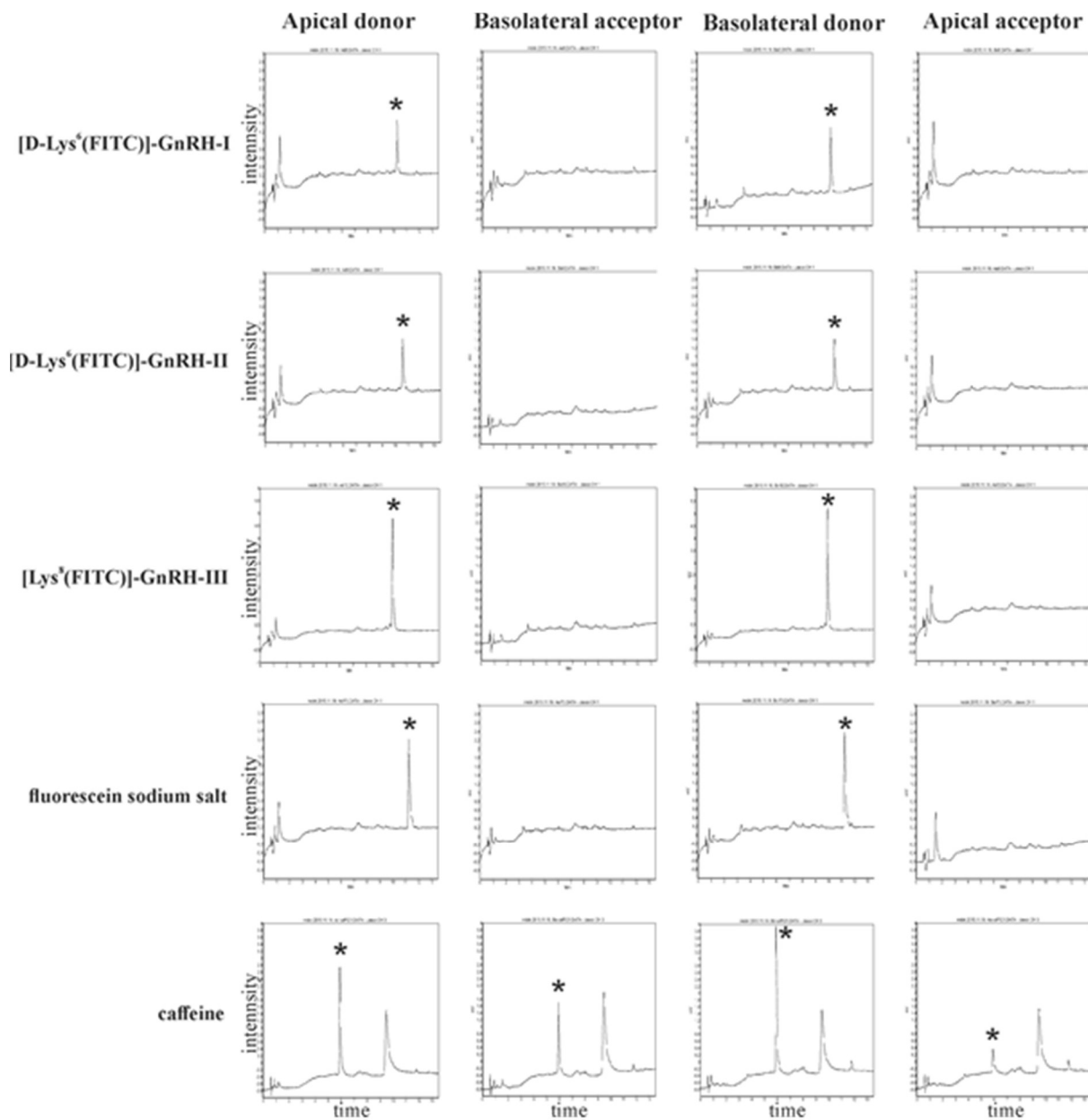
A 19. és 20. ábrák a relatív MFI értékekből számított ΔMFI értékeket tartalmazzák:

$$\Delta\text{MFI (vegyület; [y(μM)])} =$$

$$\text{relatív MFI (vegyület; [5h; y(μM)])} - \text{relatív MFI (vegyület; [1h; y(μM)])}$$

ahol: y=1 vagy 10 μM; ΔMFI: fluoreszcencia intenzitás medián változás

13.1.5 MDCK HPLC-UV kromatogramok



52. ábra: MDCK permeabilitás vizsgálat (HPLC III. módszer, $\lambda=254$ nm): a [D-Lys⁶(FITC)]-GnRH-I, [D-Lys⁶(FITC)]-GnRH-II, [Lys⁸(FITC)]-GnRH-III, fluoreszcein és koffein.

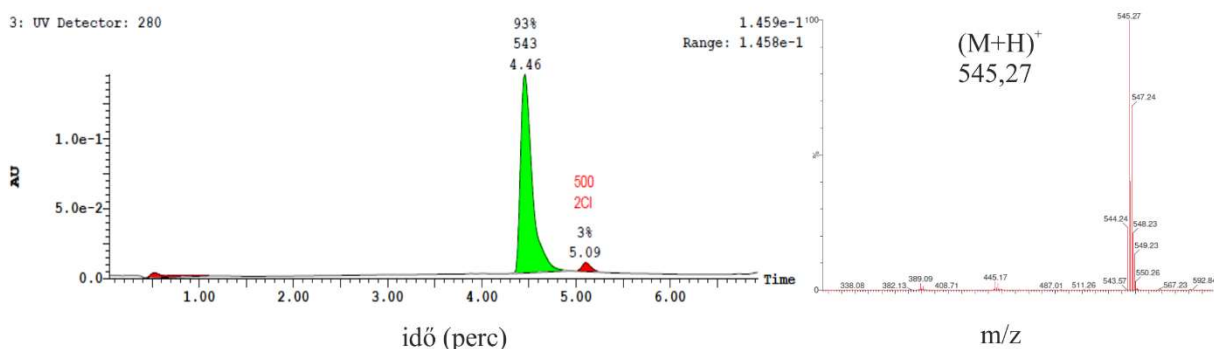
13.2 Crizotinib analógok és konjugátumok

13.2.1 Crizotinib analógok szerkezetigazolása

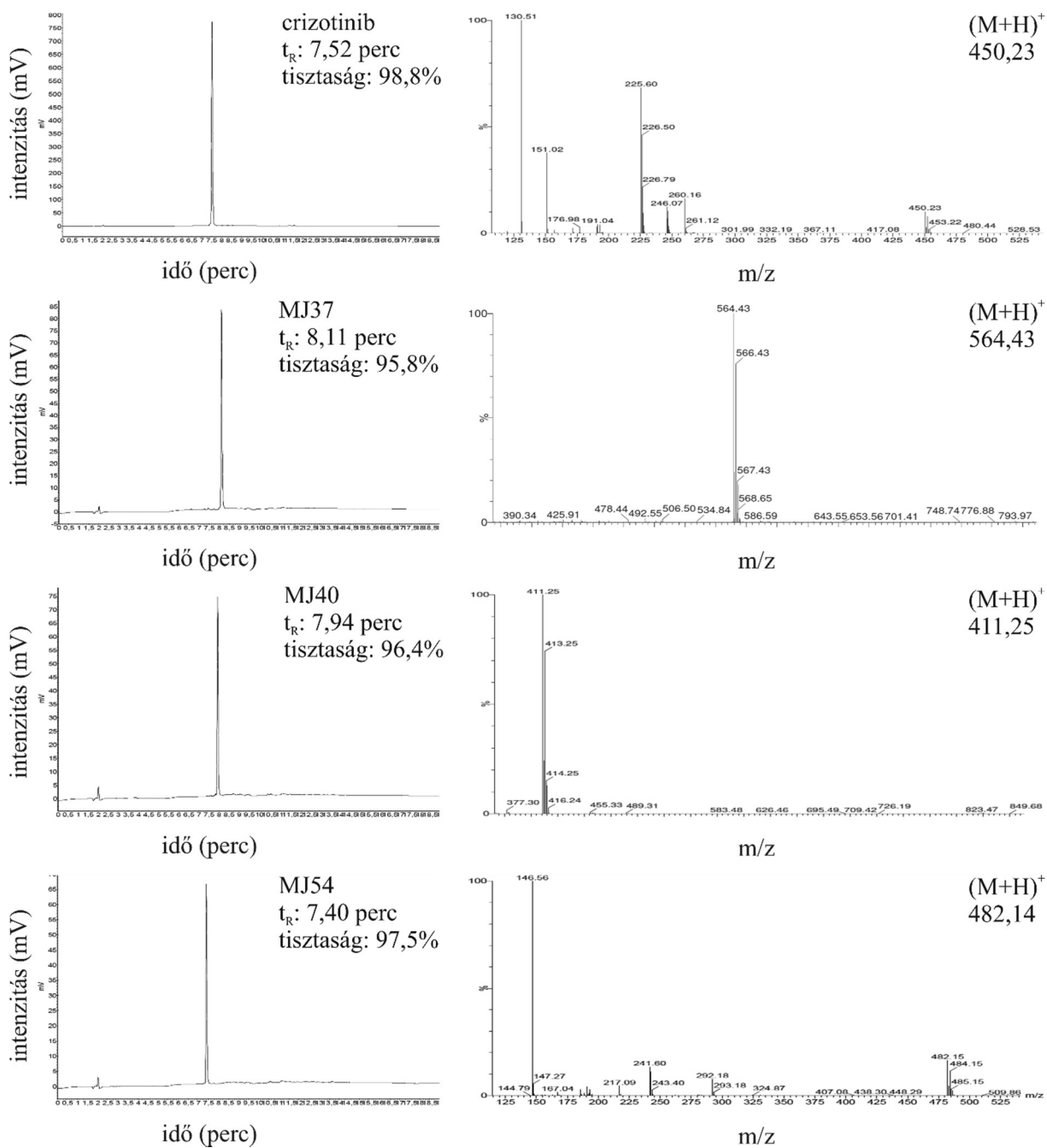
LC-MS analízis (Vichem Chemie Kutató Kft.):

HPLC típusa: Waters Alliance 2795, Waters 996 PDA
 Áramlási sebesség: 2 ml/perc
 Állófázis: Waters XBridge C18 oszlop (5cm x 4.6mm, 3.5µm)
 Eluens: A eluens: MilliQ water, 0,1 % hangyasav; B eluens: ACN
 Gradiens: 0,0 perc 5 % B; 0,5 perc 5 % B; 5,5 perc 95 % B; 6,0 perc 95 % B
 Mintatérfogat: 2-5µl, 5 mM DMSO oldatból
 MS típusa: Waters Acquity SQD (ESI)

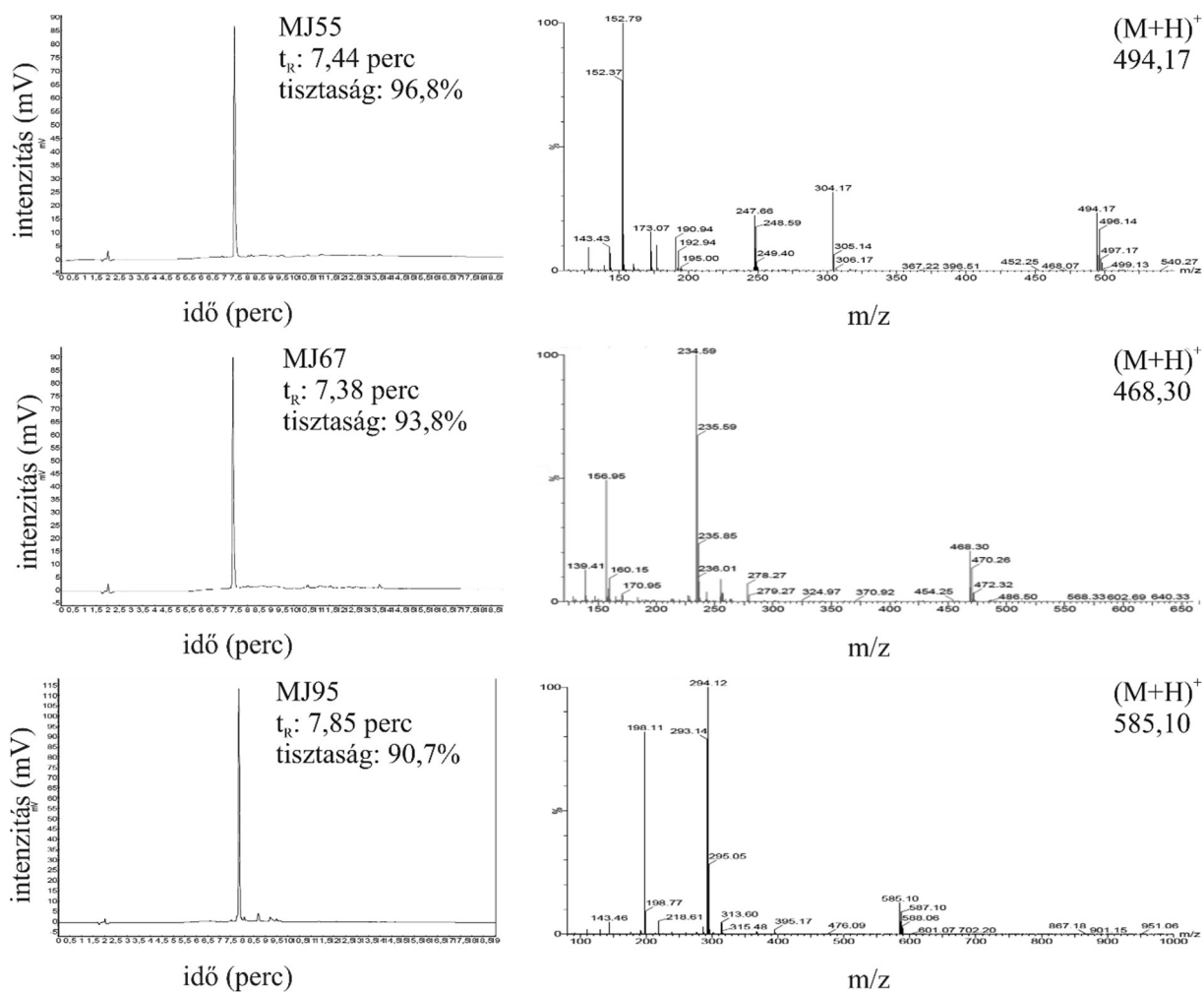
Tömegspektrométer beállításai: (Ionization: ES⁺, Source block temp: 120°C, Desolvation temp: 250°C, Desolvation Gas: 500 l/h, Cone Gas: 80 l/h, Capillary: 3000 V, Cone: 30 V, Extractor: 6 V, Rf Lens: 0.1 V, Scan: 80 to 1000 m/z in 1 sec., Inter-scan delay: 0.1 s).



53. ábra AzMJ9B vegyület szerkezetigazolása. (Vichem Chemie Kutató Kft.)



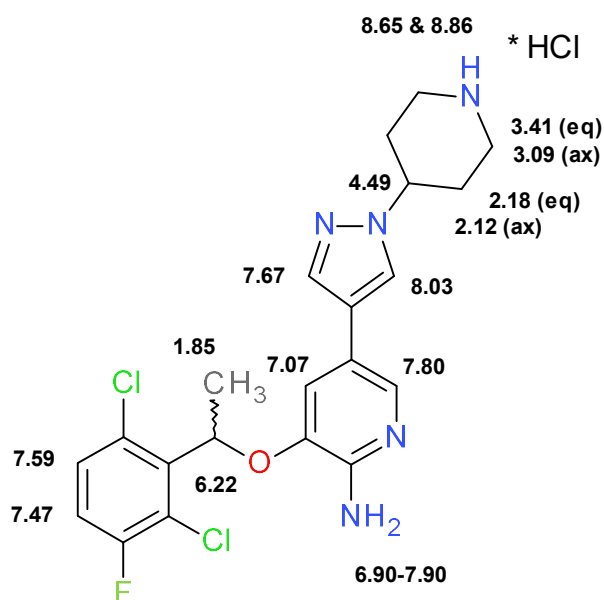
54. Ábra: HPLC-UV kromatogramok (I. módszer, $\lambda=254$ nm) és ESI-MS felvételek (Vichem Chemie Kutató Kft.): crizotinib, MJ37, MJ40 és MJ54 vegyületek.



55. ábra: HPLC-UV kromatogramok (I. módszer, $\lambda=254$ nm) és ESI-MS felvételek (Vichem Chemie Kutató Kft.): MJ55, MJ67 és MJ95 vegyületek.

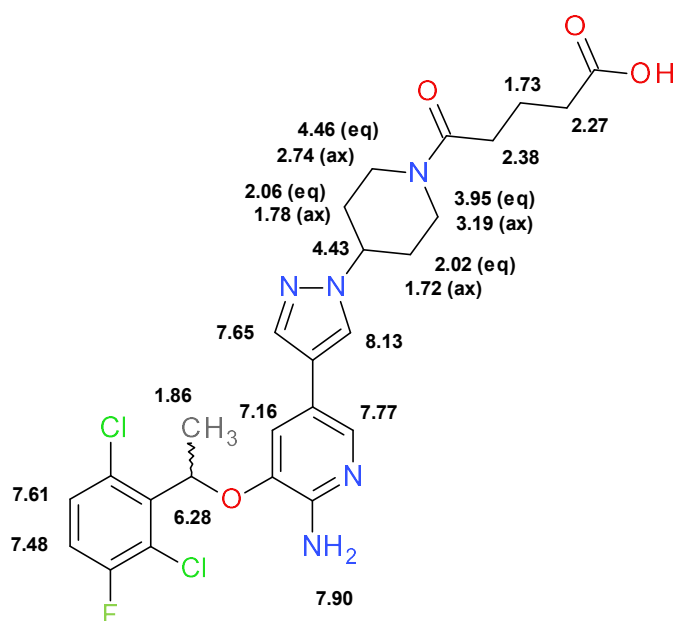
¹H NMR spektrometira (Vichem Chemie Kutató Kft.):

Az NMR felvételek 7.05 Tesla térerejű, 5 mm-es $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ dual inverz z-gradiens mérőfejjel felszerelt Bruker Avance 300 NMR spektrométeren készültek oldatfázisban, deuterált dimetilszulfoxid ($\text{DMSO-}d_6$) oldószerben, 30 °C-on. A műszer vezérlése, az adatfeldolgozás és kiértékelés TopSpin 1.3 programcsomaggal történt.



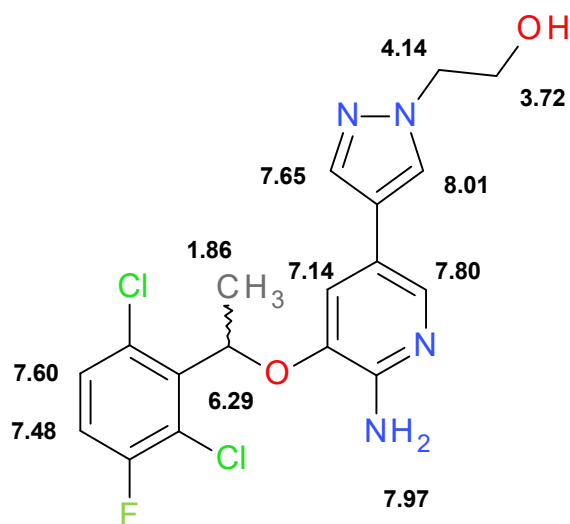
MJ22

Molecular Weight = 450,35
Exact Mass = 449
Molecular Formula = C₂₁H₂₂Cl₂FN₅O



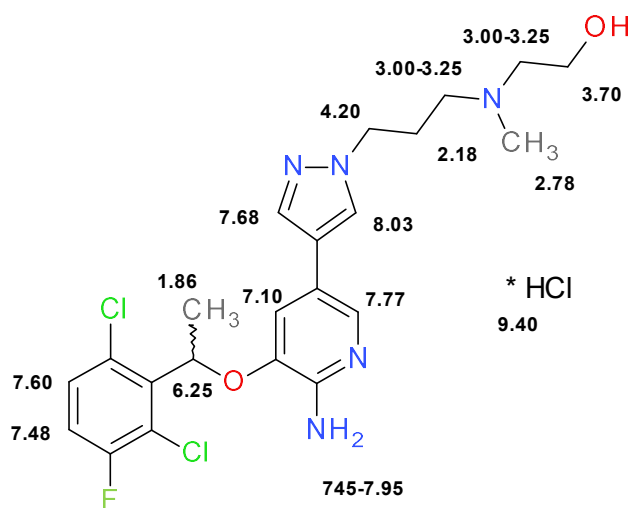
MJ37

Molecular Weight =564,45
Exact Mass =563
Molecular Formula =C₂₆H₂₈Cl₂FN₅O₄

**MJ-40**

Molecular Weight =411,27

Exact Mass =410

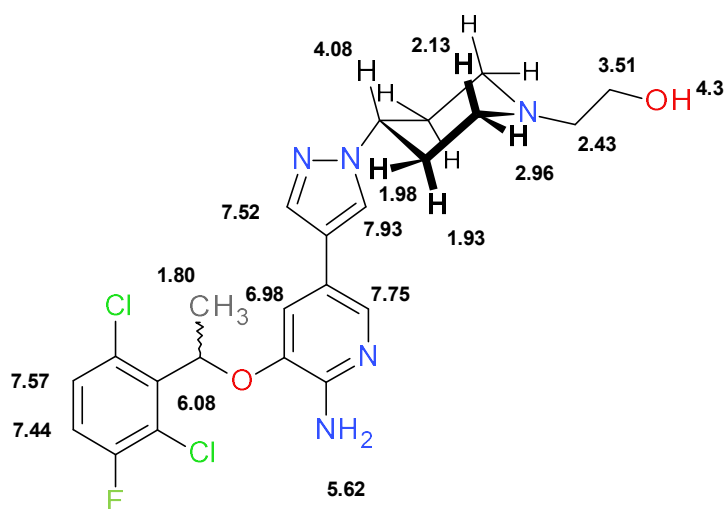
Molecular Formula =C₁₈H₁₇Cl₂FN₄O₂**MJ-54*** HCl
9.40

Molecular Weight =482,39

Exact Mass =481

Molecular Formula =C₂₂H₂₆Cl₂FN₅O₂

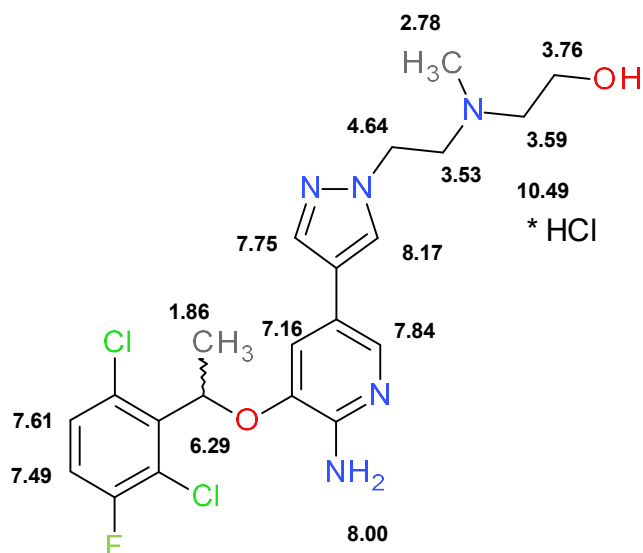
AND Enantiomer

**MJ-55**

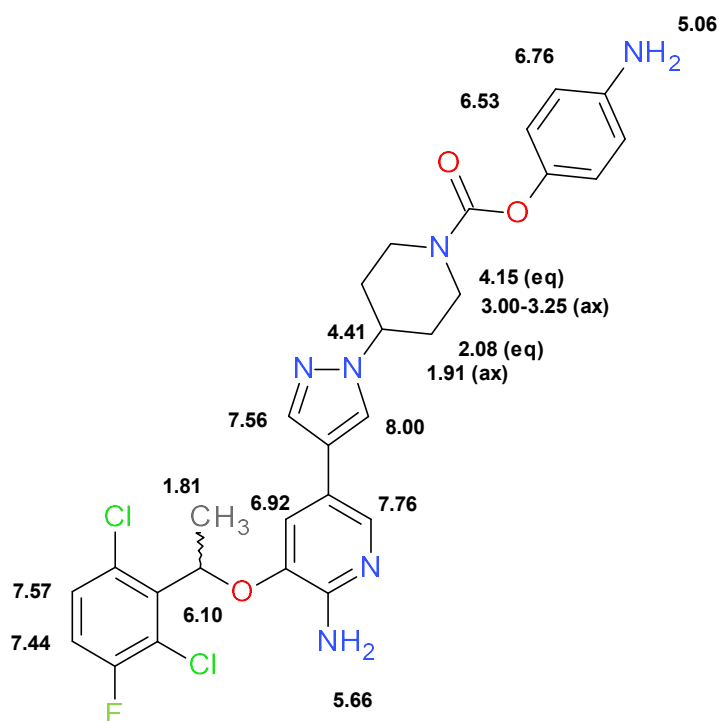
Molecular Weight =494,40

Exact Mass =493

Molecular Formula =C₂₃H₂₆Cl₂FN₅O₂

**MJ-67**

Molecular Weight =468,36
 Exact Mass =467
 Molecular Formula =C₂₁H₂₄Cl₂FN₅O₂

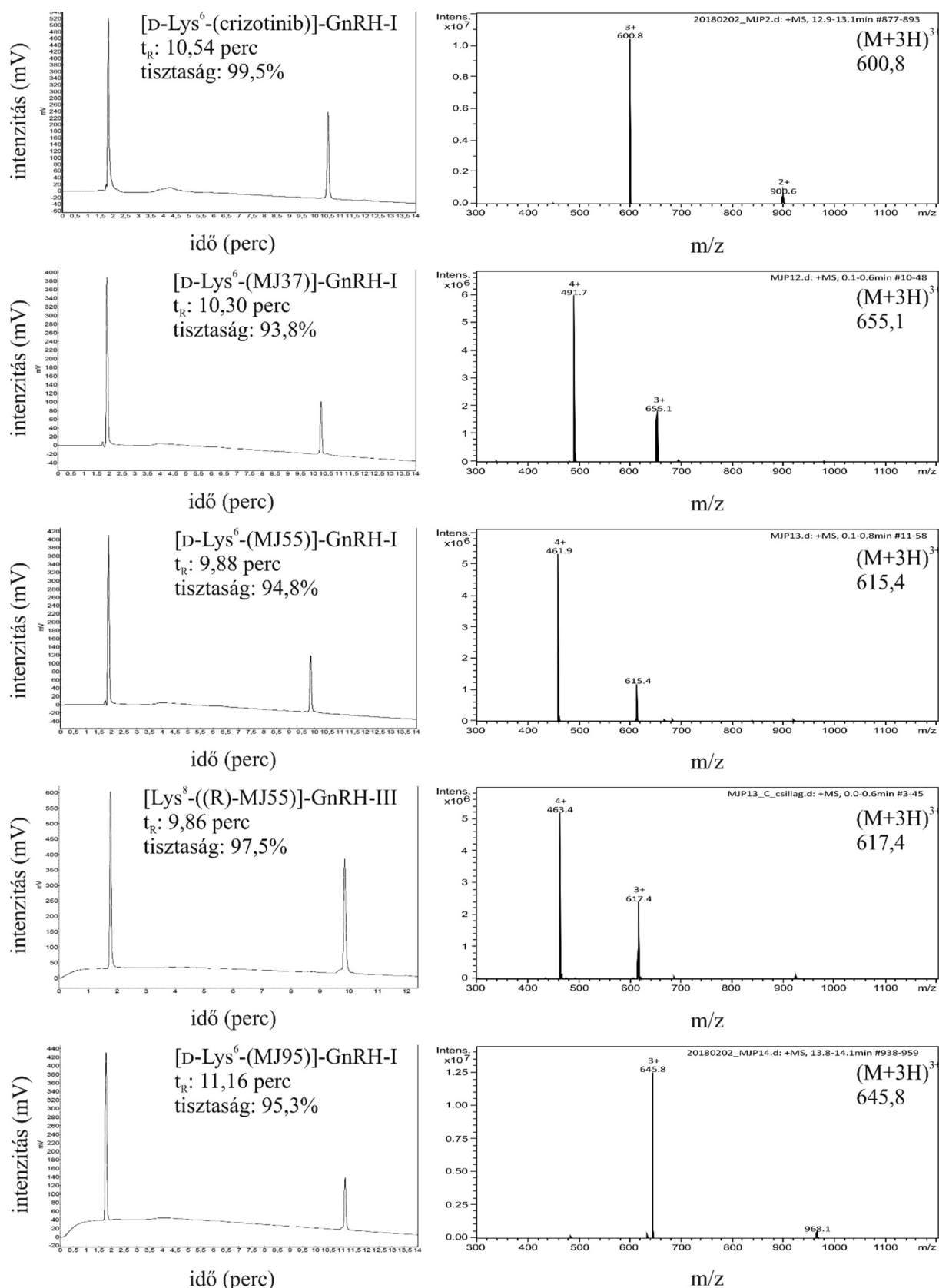
**MJ-95**

Molecular Weight =585,47
 Exact Mass =584
 Molecular Formula =C₂₈H₂₇Cl₂FN₆O₃

13.2.2 Crizotinib-konjugátumok szerkezetigazolása

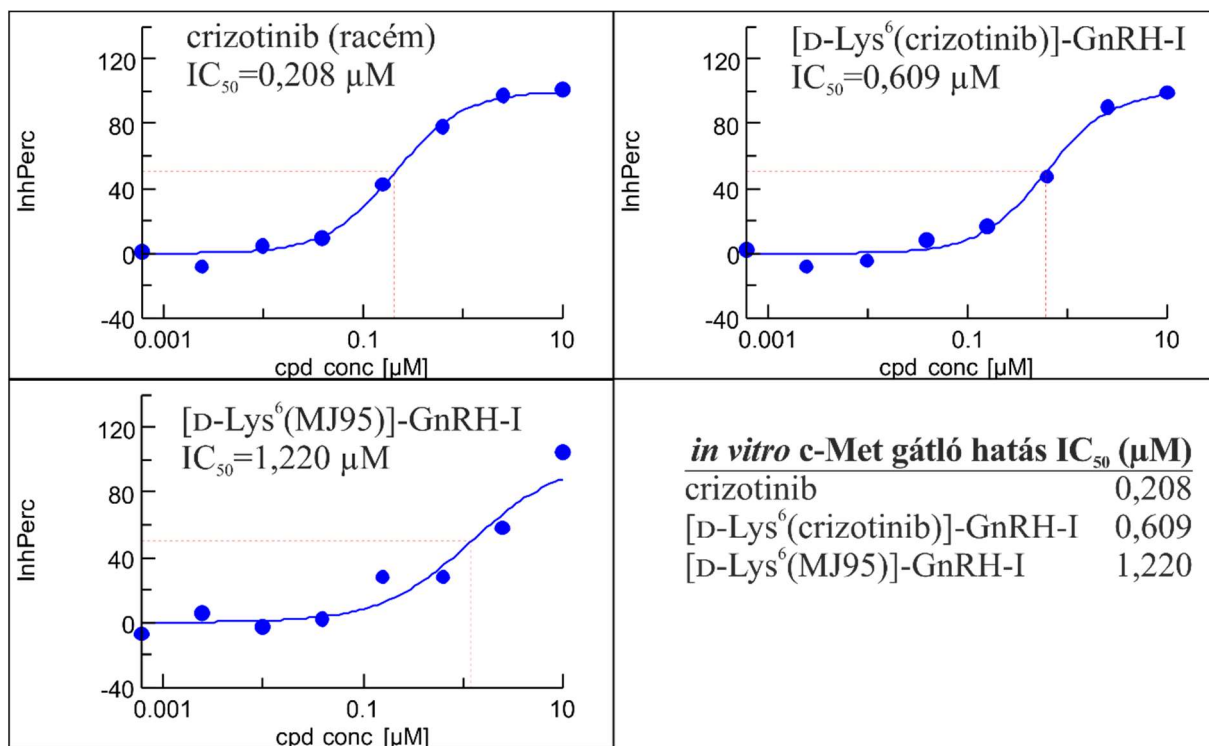
LC-MS analízis (ELTE Analitikai Kémiai Tanszék):

HPLC típusa:	Jasco PU-2085plus
Oszlop típusa:	Supelco Ascentis C18-as oszlop, 2,1 x 150 mm, 3 um
Eluensek:	A: víz, 0,1% hangyasav; B: acetonitril/víz 80:20, 0,1% hangyasav
Gradiens:	0 perc: 2% B; 2 perc: 2% B; 18 perc: 70% B
Csatlakozás módja:	200 µl/perc áramlási sebességgel, közvetlen LC-MS csatlakozás
MS típusa:	Bruker Esquire 3000+, elektropray ionforrással



56. ábra: HPLC-UV kromatogramok (II. módszer, $\lambda=220$ nm) és ESI-MS felvételek (ELTE Analitikai Kémiai Tanszék): [D-Lys⁶(crizotinib)]-GnRH-I, [D-Lys⁶(MJ37)]-GnRH-I, [D-Lys⁶(MJ55)]-GnRH-I, [Lys⁸(R)-MJ55]-GnRH-III, [D-Lys⁶(MJ95)]-GnRH-I konjugátumok.

13.2.3 *In vitro* c-Met-gátló hatékonyság vizsgálata



57. ábra: *In vitro* rekomináns c-Met-gátló hatékonyság vizsgálat (Vichem Chemie Kutató Kft.): racém crizotinib, [D-Lys⁶(crizotinib)]-GnRH-I és [D-Lys⁶(MJ95)]-GnRH-I.

13.2.4 Crizotinib-GnRH-I és MJ95-GnRH-I stabilitás vizsgálata lizoszóma preparátumban

Protokoll leírása (ELTE Analitikai Kémiai Tanszék):

- 1.) [D-Lys⁶(crizotinib)]-GnRH-I és [D-Lys⁶(MJ95)]-GnRH-I feloldása vízben. Koncentráció: 10 $\mu g/\mu l$
- 2.) Konjugátumok hígítása pufferben 0,25 $\mu g/\mu l$ koncentrációra: végtérfogat: 90 μl
- 3.) Patkány májsejtekből kinyert lizoszóma preparátum hígítása: 10 μl puffer hozzáadása, alapos keverés.
- 4.) Reakció összemérése: 3 μl hígított lizoszóma preparátumot adtam minden 90 μl térfogatú mintához. (Lizprep fehérjetartalom: peptid=1:1 (w/w))
- 5.) Reakciókeverékek inkubálása 37°C-on, 600 rpm folyamatos keverés mellett.
- 6.) Mintavételek: 0 perc, 5 perc, 2, 6 és 24 óra múlva, 18 μl térfogatú minták.
- 7.) Reakció leállítása 2 μl hangyasav hozzáadásával.
- 8.) LC-MS mérés azonnal, fagyasztás és további tisztítás nélkül (LC-MS módszer leírása: 13.2.2 fejezet).